THESE

PRESENTEE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Hubert CONDAMINE

SUR LA REGULATION DU METABOLISME DE

LA PROLINE CHEZ *ESCHERICHIA COLI* K 12

SOUTENUE LE 29 AVR. 1970 1970 DEVANT LA

COMMISSION D'EXAMEN

Mme	GANS	PRESIDENT
MM	BUTTIN GROS JACOB	EXAMINATEURS

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549902_0003

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

Hubert CONDAMINE

SUR LA REGULATION DU METABOLISME DE LA PROLINE CHEZ *ESCHERICHIA COLI* K 12

SOUTENUE LE 1970 DEVANT LA

COMMISSION D'EXAMEN

Mme GANS PRESIDENT

MM BUTTIN, GROS, JACOB — EXAMINATEURS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Pour la plupart des hommes, la vie se transforme quand ils en sont arrivés à un certain point de leurs recherches; ils se marient et occupent des situations dans la vie, par suite desquelles ils doivent pour sauver les apparences finir quelque chose, obtenir des résultats (car le respect humain exige d'avoir un résultat ; quant à ce que la honte devant Dieu pourrait exiger, on y pense moins).

S. Kierkegaard.

A B R E V I A T I O N S

AzCA	:	acide azétidine - 4 - carboxylique
EMS	:	éthylméthanesulfonate
NAD	:	nicotinamide - adénine dinucléotide
NADH	:	dihydronicotinamide - adénine dinucléotide
NADP	:	nicotinamide - adénine dinucléotide phosphate
NADPH	:	dihydronicotinamide - adénine dinucléotide phosphate
NG	ou	nitrosaguanidine : N-méthyl - N'-nitro - N-nitrosoguanidine
oAB	:	orthoaminobenzaldéhyde
PCA	:	acide $\Delta_1$pyrroline - 5 - carboxylique
ThCA	:	acide thiazolidine - carboxylique
Tris	:	tris (hydroxyméthyl) aminométhane.

** **

**

CHAPITRE I

INTRODUCTION

A - GENERALITES - PLAN DE L'EXPOSE

Le travail dont l'exposé va suivre concerne le métabolisme de la proline et sa régulation chez Escherichia coli K12. On sait l'intérêt qu'a suscité au cours des dernières années l'étude de systèmes de régulation chez divers organismes et tout spécialement chez cette bactérie, où certains systèmes, particulièrement celui qui concerne l'utilisation du lactose, sont désormais compris dans le détail jusqu'au niveau moléculaire.

Le métabolisme de la proline et sa régulation constituent au contraire un domaine relativement mal compris et peu exploré. Pour ne parler que du métabolisme lui-même, de nombreuses incertitudes subsistent touchant la voie de biosynthèse de cet acide aminé. Certaines réactions sont mal connues, les enzymes qui les gouvernent le sont plus mal encore et on ne dispose à leur sujet d'aucun mode de dosage in vitro. A certains égards, ceci constituait, pour la poursuite de notre travail, une difficulté sérieuse en dépit de laquelle l'étude de ce système de régulation ne laissait pas d'offrir divers attraits. Il existe en effet, chez Escherichia coli, une voie catabolique qui permet l'utilisation de la proline comme source de carbone. On pouvait donc se demander si cette voie intervient pour règler la concentration de la cellule en proline et s'il existe une relation entre la régulation des voies de biosynthèse et de dégradation. Par ailleurs, les gènes gouvernant la synthèse des enzymes anaboliques sont répartis en deux locus.

La régulation de l'activité de gènes dispersés sur le chromosome a été moins étudiée, chez E.coli tout au moins, que celle de systèmes constitués par un opéron unique. L'exemple remarquable de la biosynthèse de l'arginine et des gènes qui la gouvernent, répartis en cinq locus, constitue un peu une exception. La question était posée de savoir si des mécanismes originaux de régulation pouvaient être mis en évidence dans un système de ce type.

Voici quel sera le plan de notre exposé :

Tout d'abord il a paru nécessaire de compléter cette introduction par une discussion des problèmes que pose encore le métabolisme de la proline chez E.coli. Il faut en effet avoir à l'esprit l'ensemble des données acquises à ce sujet, et plus encore les incertitudes qui subsistent, pour examiner les résultats ultérieurs.

Après un chapitre de méthodologie, le chapitre III exposera la génétique de notre système. Nous avons été amené à préciser certains points concernant la localisation des gènes qui ont à voir avec la biosynthèse ; l'isolement de mutants incapables d'utiliser la proline est décrit.

Le chapitre IV rapporte des expériences qui semblent bien indiquer que seuls les gènes de la voie de dégradation ont leur activité réglée par un mécanisme classique : leur fonctionnement est inductible par la proline et l'on peut isoler des mutants où la synthèse des enzymes a lieu de façon constitutive. Tout se passe comme si les gènes de la voie de biosynthèse, en revanche, avaient en toute circonstance une activité constitutive.

La production de proline est pourtant tributaire d'une régulation, que l'étude de mutants excréteurs de proline d'une part, de mutants pléiotropes négatifs d'autre part, mène à mieux comprendre. C'est de ces deux classes de mutants qu'il sera successivement question dans les chapitres V et VI. Un chapitre de conclusions rassemblera les principales caractéristiques de ce système et discutera quelques uns des nombreux problèmes qui se posent encore à son sujet.

B - LE METABOLISME DE LA PROLINE CHEZ E.COLI K 12

Le métabolisme de la proline chez E.coli K 12 est double. D'une part, une chaîne anabolique effectue la synthèse de cet acide aminé à partir de l'acide glutamique, d'autre part une voie catabolique permet de faire retour à l'acide glutamique en partant de la proline. Dans les deux cas, l'acide Δ_1-pyrroline-5-carboxylique (PCA) est un intermédiaire, mais les enzymes mis en jeu dans l'une et l'autre chaîne sont différents. Le tableau (1), page(2bis) présente l'ensemble de ce métabolisme et indique les enzymes qui catalysent les différentes réactions.

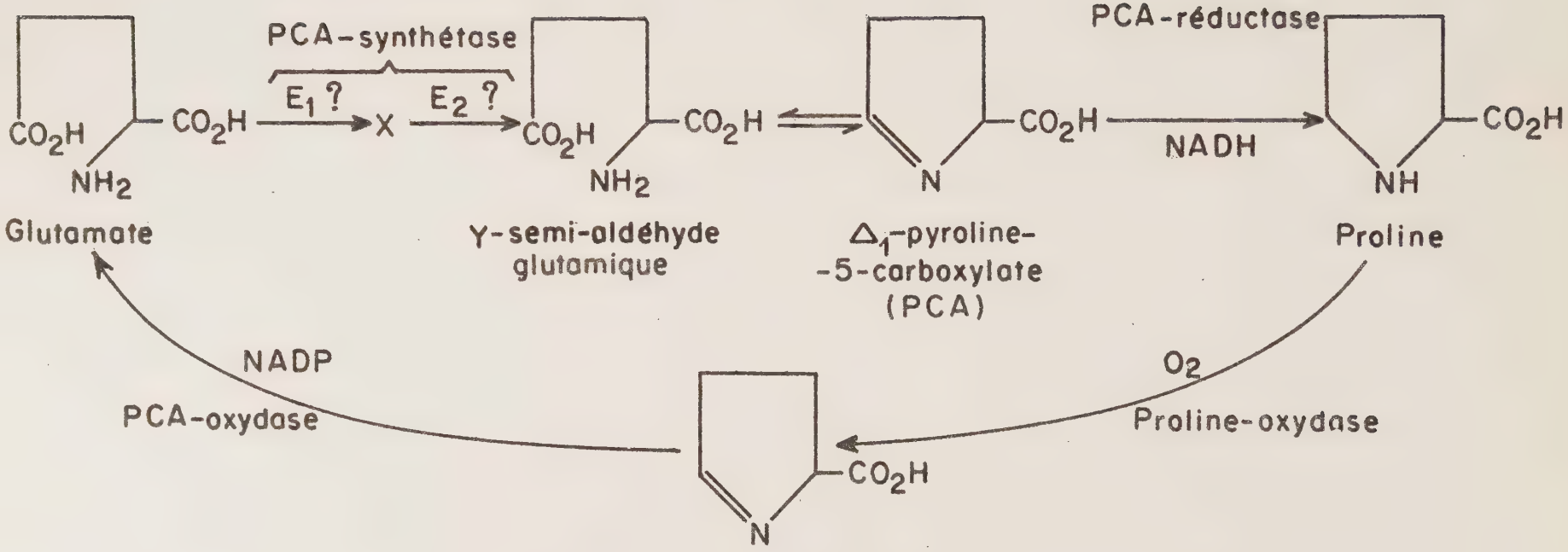


Tableau 1 - METABOLISME DE LA PROLINE CHEZ E.coli K12

Pour l'essentiel ce tableau résume les résultats d'expériences déjà anciennes dues en particulier à Vogel et à Strecker. Vogel (1) a établi l'existence du PCA comme intermédiaire dans la synthèse de la proline en isolant des mutants auxotrophes pour cet acide aminé, dont certains accumulent le PCA, alors que d'autres au contraire ne le synthétisent pas et croissent indifféremment sur un milieu additionné de proline ou de PCA. Strecker (2) (3) a étudié la conversion, in vivo, du glutamate en PCA et précisé les conditions optimales. Par ailleurs, les observations effectuées sur des mutants exigeant la proline étaient, à la même époque, confirmées par des expériences de marquage isotopique (4). Il était ainsi établi que les cinq atomes de carbone de la proline proviennent de l'acide glutamique, et, d'autre part, que la radioactivité retrouvée dans la proline lorsque la souche bactérienne était mise à croître en présence d'acide glutamique radioactif, pouvait être chassée par l'addition au milieu de proline non radioactive bien entendu, mais aussi bien, de PCA non marqué.

Les étapes de la voie de dégradation ont été établies par Frank et Ranhand (18) qui ont retrouvé chez E.coli les deux activités enzymatiques (proline-oxydase et PCA déshydrogénase) observées dans des extraits de foie de Boeuf par Strecker (19).

Toutefois le tableau comporte un certain nombre d'incertitudes qu'il convient d'exposer.

1 - Réduction de l'acide glutamique en γ semi-aldéhyde glutamique

En se reportant au tableau (1), on voit que la réduction de l'acide glutamique en γ -semi-aldéhyde s'opère en deux étapes, et met en jeu un intermédiaire hypothétique noté x. Ceci indique assez l'obscurité qui règne encore sur cette réaction. En fait, l'accumulation, à partir de l'acide glutamique, du PCA dans une souche incapable de convertir le PCA en proline, étudiée par Strecker dans des cellules entières, n'a jamais pu être retrouvée dans des extraits bactériens. La "PCA-synthétase" n'a donc jamais été étudiée in vitro et reste un enzyme (ou un complexe d'enzymes) énigmatique, de même que la (ou les) réactions qu'elle catalyse. L'existence, nullement prouvée, d'un intermédiaire entre acide glutamique et PCA, est rendue plausible par plusieurs considérations. La réaction

dont il s'agit, oxydation d'un aldéhyde en l'acide correspondant, s'effectue selon des modalités très variées à la fois selon les métabolites et selon les organismes considérés (5). Ainsi l'acétaldéhyde-déshydrogénase du foie de Mammifères catalyse une oxydation directe de l'acétaldéhyde en acide acétique, avec le NAD comme coenzyme (6) alors que dans divers systèmes bactériens (7) cette même réaction s'effectue avec transfert du groupement acétyl sur le coenzyme A. Fréquemment la réaction met en jeu un composé intermédiaire phosphorylé, et c'est le cas notamment des réactions catalysées respectivement par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et la β semi-aldéhyde aspartique-déshydrogénase. Ce dernier exemple est très proche du cas qui nous occupe. Physiologiquement, il s'agit de la réduction de l'aspartate en β semi-aldéhyde. Dans une première étape, une aspartokinase catalyse la formation d'un aspartylphosphate qui est ensuite réduit en β semi-aldéhyde aspartique sous l'effet d'une déshydrogénase utilisant le NADP comme coenzyme (8). Il est tentant de considérer que la réduction du glutamate s'opère elle aussi par l'intermédiaire d'un glutamylphosphate, mais, encore une fois, aucune preuve de l'existence d'un tel mécanisme ne peut à l'heure actuelle être avancée. Tout au plus peut-on signaler une observation due à Hirota et al. (9) : en présence de 4-nitropyridine. N-oxyde, on sélectionne avec une très haute efficacité des mutants de E.coli K 12 auxotrophes pour la proline, tous incapables de synthétiser le PCA. Il a été montré (10) que dans le milieu de culture le groupement nitro du composé sélectif est progressivement réduit en groupement nitroso, hydroxylamino et amino. Dès lors, l'interprétation suivante peut être proposée pour l'action de la drogue. Si l'on admet que le glutamylphosphate est un intermédiaire dans la synthèse du PCA, les mutants dotés d'une déshydrogénase inactive, donc éventuellement accumulateurs de glutamylphosphate, échapperaient à l'effet du 4-nitropyridine - N-oxyde grâce à la combinaison du glutamylphosphate avec le 4-hydroxylaminopyridine-N. oxyde (on sait en effet que les acylphosphates réagissent avec le groupement hydroxylamino). Ce n'est là, naturellement, qu'une hypothèse et l'on doit reconnaître d'ailleurs qu'elle ne permet guère de comprendre pourquoi seuls des mutants de la chaîne de la proline sont ici sélectionnés, à l'exclusion, par exemple, des mutants de la β semialdéhyde aspartique déshydrogénase.

Tous les essais que nous avons effectués en vue de mettre en évidence une synthèse de PCA in vitro, à partir de glutamate, en présence d'extraits bactériens ont échoué. La seule méthode, à notre connaissance, pour évaluer l'activité

de la PCA synthétase, reste le dosage de l'accumulation de PCA, in vivo, chez un mutant dépourvu de PCA réductase. Il est clair que l'obtention d'une méthode de dosage in vitro conditionne la solution du problème que nous venons d'examiner, savoir le nombre d'étapes enzymatiques nécessaires pour réduire le glutamate en γ -semialdéhyde. Cette question n'a pas qu'un intérêt enzymologique. Nous verrons que de la réponse qu'on lui apporte dépend l'interprétation qu'on peut donner de certains mutants de la voie de biosynthèse (voir chap. III et V).

2 - L'équilibre entre les formes linéaire et cyclique du γ-semialdéhyde glutamique.

Dans le tableau du métabolisme de la proline, il est supposé que la forme linéaire du γ-semialdéhyde glutamique est en équilibre avec la forme cyclique, le passage d'une forme à l'autre s'opérant avec fixation ou élimination d'une molécule d'eau. En outre, aucun enzyme n'est supposé accélérer la formation de cet équilibre.

En fait, ce ne sont là que des hypothèses. Il n'est d'ailleurs nullement prouvé que la PCA réductase, enzyme qui convertit le PCA en proline, ait pour substrat la forme cyclique et non la forme linéaire. On trouve dans le rein des Mammifères une PCA réductase qui forme la proline à partir de l'acide Δ_1-pyrroline-2-carboxylique (16). Or, Petrakis et Greenberg (11) ont montré que dans ce cas l'activité de l'enzyme est inhibée par un analogue du substrat qui n'existe que sous la forme linéaire, le N-formyl-δ -amino α-cétovalérate. Ceci implique que le substrat de l'enzyme est la forme linéaire, non la forme cyclique. Rien n'interdit de penser qu'il en est de même pour la pyrroline-5-carboxylate réductase et, de fait, se fondant sur la grande sensibilité de la pyrroline-5-carboxylate-réductase du foie de Rat à l'égard des réactifs des groupements thiols, et sur l'effet protecteur du sustrat, Smith et Greenberg (17) ont proposé pour cet enzyme un mode d'action dans lequel un groupement-SH de l'enzyme se lie au groupement aldéhydique du substrat pour former un hémithioacétal. C'est dire que là encore le substrat est envisagé sous sa forme linéaire.

L'importance de cette question, pour ce qui concerne notre travail, tient à ceci : si la forme linéaire du PCA est bien, chez E.coli K 12, le substrat

de la PCA réductase, un seul enzyme est alors nécessaire pour transformer le PCA en proline. Si au contraire le substrat est la forme cyclique, on peut se demander si cette cyclisation s'effectue spontanément ou si un enzyme est présent pour l'accélérer. L'existence d'un tel enzyme est une possibilité qu'on doit garder présente à l'esprit pour interpréter les propriétés de certains mutants (voir chap.VI). On notera en revanche que dans la voie de dégradation de la proline, telle qu'elle est schématisée dans le tableau (1), il n'est pas fait mention de l'équilibre entre les formes linéaire et cyclique du PCA. Le problème serait en fait à poser dans les mêmes termes, mais il se trouve que sa solution serait de peu de conséquence pour l'interprétation des mutations affectant cette voie que nous avons isolées (voir chap. III et IV).

Signalons toutefois l'observation, due à Stecker (19), selon laquelle la PCA-deshydrogénase du foie de Boeuf est inhibée par la proline, ce qui laisse à penser que le substrat de l'enzyme est, cette fois, la forme cyclique.

3 - Relations entre la biosynthèse de la proline et celle de l'arginine

On peut se demander si la voie de biosynthèse de la proline, telle qu'elle est décrite dans le tableau (1) est l'unique moyen dont dispose E.coli pour fabriquer cet acide aminé. On sait que les premières étapes de la biosynthèse de l'arginine sont calquées sur celles de la voie qui mène à la proline, avec cette différence que les réactions mettent en jeu des métabolites N-acétylés : N-acétylglutamate, γ-semialdéhyde -N-acétylglutamique, etc... Il suffirait qu'une acétylase spécifique du système de la proline fabrique du PCA en hydrolysant l'aldéhyde N-acétylglutamique pour que les enzymes des premières étapes de la synthèse de l'arginine servent aussi à la synthèse de la proline. Qu'il puisse en être ainsi dans certains cas particuliers a d'ailleurs été démontré. Tseng-Tong Kuo et B.A.D. Stocker (12) ont isolé, à partir de mutants de Salmonella typhimurium porteurs de délétions des cistrons proA et proB, incapables par conséquent de synthétiser le PCA, des variants capables de croître en l'absence de proline ou de PCA. L'analyse de ces variants a montré qu'ils étaient porteurs d'une mutation supplémentaire dans le gène de structure de la N -acétylornithine- δ-transaminase. En l'absence de cette activité enzymatique, le γ-semialdéhyde-N-acétylglutamique s'accumule et sa désacétylation permet la synthèse de PCA. Le même phénomène de suppression a été décrit chez E.coli W par Itikawa et al. (13).

Signalons d'autre part que la formation de proline à partir de l'acide N-acétylglutamique en présence d'extraits d'E.coli a été décrite par Reed et Lukens (14). Dans ce cas, il apparaît que la formation de PCA s'effectue à partir de l'ornithine, à la faveur d'une transamination entre l'ornithine et l'α-cétoglutarate.

Il est douteux pourtant que de tels mécanismes jouent un rôle important dans la biosynthèse de la proline. De fait, nous n'avons jamais rencontré de mutants devenus, en une seule étape, auxotrophes à la fois pour la proline et l'arginine. La suppression du phénotype pro^- par une mutation affectant la biosynthèse de l'arginine est à considérer pour interpréter certains cas de réversion au phénotype pro^+. Mais par ailleurs nous admettons que la voie de biosynthèse de la proline est chez E.coli K12 parfaitement distincte de celle de l'arginine, à la différence de ce qui a lieu chez certains microorganismes (15).

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

A - CULTURES BACTERIENNES

Les milieux nutritifs liquides utilisés étaient de deux sortes :

a/ Milieu riche :

Bacto-tryptone	10	g
Yeast extract	5	g
Chlorure de sodium	5	g

pH ajusté à 7 avec de la soude

Volume amené à 1 litre avec de l'eau distillée.

b/ Milieu minimal :

Phosphate monopotassique	13,6	g
Sulfate d'ammonium	2	g
Sulfate de magnésium	0,2	g
Sulfate de fer	0,005	g

pH amené à 7,2 avec de la lessive de potasse.

Volume amené à 1 litre avec de l'eau distillée.

A cette solution saline (milieu 63) étaient ajoutés :

- un aliment carboné (glucose, glycérol) à la concentration finale 4 g/l.
- tous les facteurs de croissance éventuellement nécessaires à la concentration usuelle 0,1 g/l.

Les milieux étaient stérilisés par chauffage à 120° C pendant 20 mn. Les cultures étaient agitées à 37° C.

B - DOSAGES ENZYMATIQUES

1/ Taux d'accumulation de PCA in vivo

La conversion du glutamate en PCA n'a jamais été observée *in vitro*. Pour estimer l'activité enzymatique qui effectue cette conversion, nous avons suivi l'accumulation de PCA *in vivo* chez un mutant dépourvu de PCA réductase incubé en présence de glutamate. Les conditions de l'expérience étaient pour l'essentiel les conditions optimales telles qu'elles ont été déterminées par Strecker (2), (3).

Une culture bactérienne en phase exponentielle, (100 ml) contenant au moins 10^9 bactéries par millilitre était centrifugée ; le culot bactérien obtenu était remis en suspension et lavé dans 10 ml de tampon Tris $\frac{M}{20}$, pH 7,5. Après une nouvelle centrifugation, les bactéries étaient remises en suspension dans 5 ml du même tampon Tris. 4 ml de cette suspension bactérienne étaient placés dans un erlenmeyer mis à agiter dans un bain-marie à 37° C. Après 10 mn d'agitation, on ajoutait successivement à la suspension :

- 5 ml de glutamate en solution 10^{-1} M dans le tampon Tris $\frac{M}{20}$, et amené à pH 7,5,
- 1 ml d'une solution d'AMP 5.10^{-2}M amenée à pH 8 et,
- 1 ml d'une solution de pyruvate de sodium 10^{-1} M.

Dans le mélange continuellement agité, on prélevait toutes les 10 minutes, 1 ml qu'on déposait dans un tube à essais où l'on ajoutait rapidement 1 ml d'éthanol et 1 ml d'une solution dans l'éthanol d'acide trichloracétique (100 g/l) et d'o-aminobenzaldéhyde (10 g/l).

On laissait se développer la coloration à température ordinaire pendant 30 à 60 mn, après quoi les débris précipités par l'acide trichloroacétique étaient éliminés par centrifugation. On lisait dans un spectrophotomètre la densité optique du surnageant à 430 mμ.

Fig. 1 - Accumulation de PCA par la souche G 15.

Pour les conditions de dosage, voir le texte. En ordonnées, on a (par mg de protéines) porté directement les accroissements de densité optique lus à 430 mμ dans les conditions décrites. Le coefficient d'extinction molaire du composé coloré obtenu n'ayant pas été déterminé, on n'a pu calculer les quantités de PCA correspondant à ces accroissements.

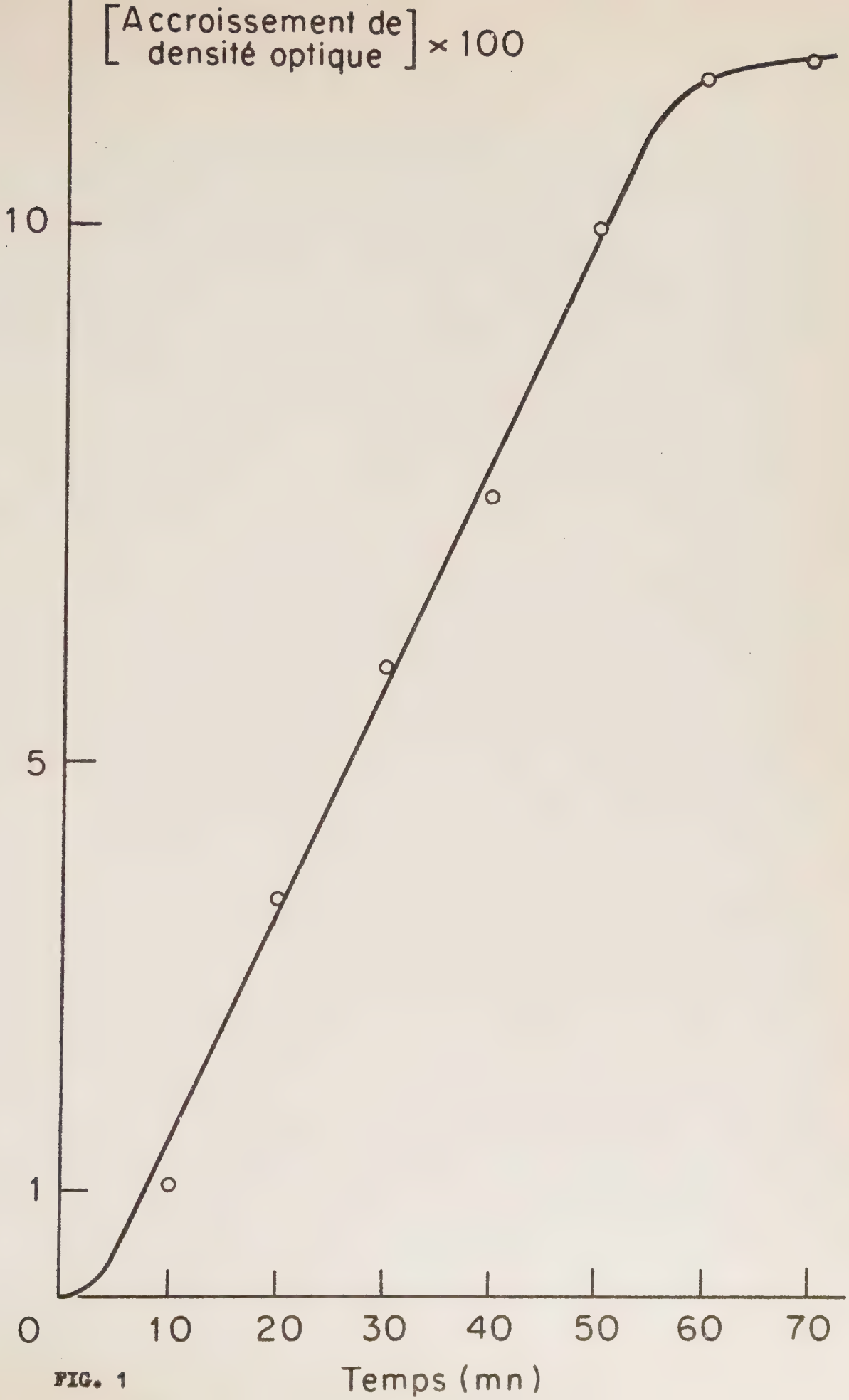

[Accroissement de densité optique] × 100
10
5
1
0
10
20
30
40
50
60
70
Temps (mn)

FIG. 1

Les résultats sont exprimés en nombre, multiplié par 100, d'équivalents de PCA accumulés par heure et par milligramme de protéines bactériennes. On verra (fig. 1) que l'accumulation a lieu de façon linéaire en fonction du temps pendant une heure ou plus. Fréquemment, on observe, après l'addition de glutamate à la suspension bactérienne, un temps de latence, d'une dizaine de minutes, après lequel démarre l'accumulation de PCA. C'est évidemment la portion linéaire de la courbe d'accumulation qui était utilisée pour estimer l'activité qui convertit le glutamate en PCA.

Nous avons vérifié que la pente d'accumulation est proportionnelle à la concentration de la suspension en bactéries.

L'activité de la PCA synthétase déterminée par cette méthode appelle quelques commentaires. S'il est vrai que la PCA synthétase est en fait un complexe de plusieurs enzymes, on n'a évidemment aucun moyen de déterminer quelle est, dans la série de réactions catalysées par ce complexe, l'étape limitante qui règle la vitesse d'accumulation. Il se pourrait d'ailleurs que, au moins chez certaines souches, intervienne de façon limitante un processus qui n'a rien à voir avec l'activité enzymatique qu'on cherche à atteindre : on pourrait, par exemple, imaginer que la perméation du glutamate soit dans ce cas.

Par ailleurs, la plupart des souches que nous avons examinées pour la PCA synthétase renfermaient un peu de PCA oxydase, enzyme qui réoxyde le PCA en glutamate. La présence de cet enzyme était induite par la proline nécessaire pour faire croître le mutant accumulateur de PCA. Il s'ensuit que le taux d'accumulation du PCA était déterminé par défaut. En définitive, la mesure de l'accumulation de PCA ne peut pas être considérée comme une détermination précise de l'activité de la PCA synthétase ; il s'agit plutôt d'une méthode semi-quantitative, qui permet en tout cas sans ambigüité de dire si cette activité est, ou non, présente dans une souche donnée.

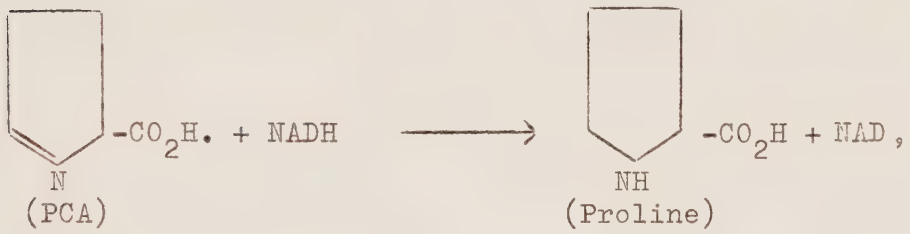
2/ Dosage de la PCA réductase

a/ Extraction

Une culture bactérienne en phase exponentielle était centrifugée et lavée dans un tampon phosphate de potassium pH 7, 2.10^{-2} M, puis remise en suspension dans ce même tampon. Les bactéries étaient rompues par action des ultrasons (à l'aide d'un appareil type Mullard) pendant 3 mn environ, les débris cellulaires éliminés par centrifugation, et le surnageant dialysé pendant plusieurs heures dans le tampon phosphate.

b/ Dosage

La réaction catalysée par la PCA réductase s'écrit :



On peut donc suivre la diminution de densité optique à 340 mμ dans un mélange comportant l'extrait brut, le PCA et le NADH.

Les conditions pratiques utilisées étaient les suivantes : la réaction était effectuée à 30° C en tampon phosphate pH 7, 2.10^{-2}M. Le volume du milieu réactionnel était 3 ml et comportait 0,3 mg de PCA et 0,3 mg de NADH . Après addition de l'enzyme, on suivait la variation de la densité optique pendant deux ou trois minutes. La densité optique décroit de façon linéaire pendant plus de 5 minutes (fig. 2). L'oxydation du NADH était d'autre part suivie parallèlement dans une cuve contenant l'enzyme et le NADH, mais non le PCA, de manière à déduire l'activité NADH-oxydasique non spécifique de la PCA réductase.

Les résultats sont exprimés en μ Moles de NADH oxydé par mn et par mg de protéines.

3/ Dosage de la proline-oxydase

a/ Extraction

Les cellules, en phase de culture exponentielle, sont récoltées par centrifugation, lavées dans un tampon Tris 10^{-2} M, Mg^{++} 10^{-2} M, pH 8, et remises en suspension dans le même tampon, de manière à obtenir un volume de suspension de quelques (= 2 à 6 ml) ml. L'extraction de l'enzyme est alors réalisée par sonication, pendant une durée, variable selon la concentration en cellules, de 90 à 180 secondes. Les débris cellulaires grossiers sont éliminés par centrifugation, et l'extrait dialysé dans le tampon d'extraction pendant une nuit. Avec un extrait non dialysé, on observe en effet que l'activité n'est pas proportionnelle à la quantité d'extrait ajoutée, vraisemblablement en raison du fait que le produit de la réaction, le PCA, ne s'accumule pas mais est transformé, grâce à la présence dans l'extrait de NADP et/ ou de NADH, par la PCA-réductase et la PCA- oxydase.

b/ Dosage

Sous l'action de la proline-oxydase, la proline est transformée en PCA, selon l'équation réactionnelle :

On arrête la réaction après un temps variable, et on mesure la quantité de PCA formé à l'aide d'o-aminobenzaldéhyde. Ce produit se combine quantitativement au PCA en fournissant un composé jaune, dont on lit l'absorption à 430 mμ.

Pratiquement, la réaction est effectuée à 37° C, en tube ouvert et en agitant (l'oxygène de l'air est nécessaire). A 1,7 ml d'extrait en solution dans un tampon Tris 10^{-2}M, Mg^{++} 10^{-2}M on ajoute, au temps 0, 0,3 ml d'une solution de proline 10^{-1}M dans le tampon (Tris, Mg^{++}).

Fig. 2 - Oxydation du NADH par un extrait brut d'E.coli (souche PA 417) en présence et en l'absence de PCA.

O : tampon phosphate, extrait bactérien, NADH , PCA

● : tampon phosphate, extrait bactérien, NADH.

Pour les conditions , voir le texte.

Fig. 3 - Dosage de la proline-oxydase. Proportionalité entre la quantité de PCA formé et le temps d'incubation.

Les densités optiques directement portées représentent des équivalents de PCA (cf légende de la fig. 1).

Pour les conditions voir le texte.

Fig. 4 - Dosage de la proline-oxydase. Proportionalité entre la quantité de PCA formé et la quantité d'extrait bactérien ajouté au milieu réactionnel.

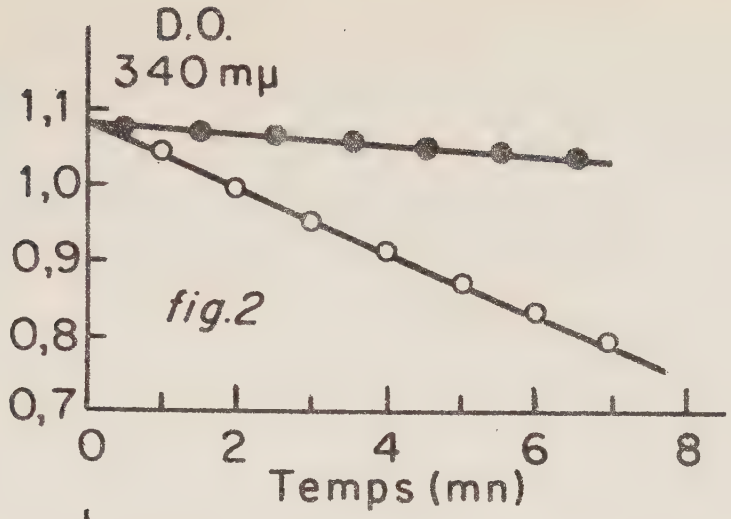


fig.2

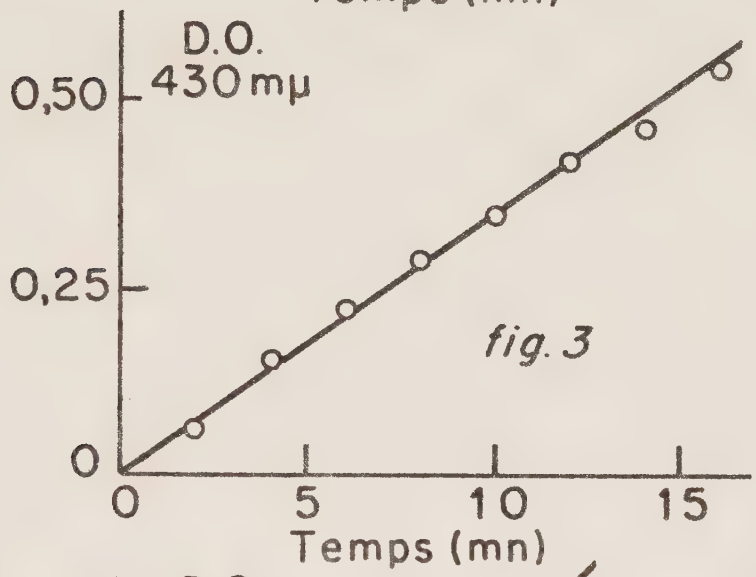


fig. 3

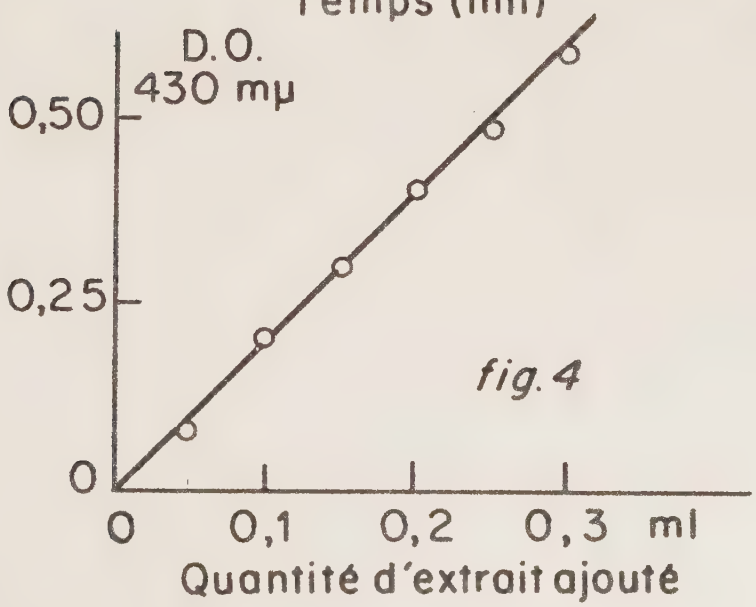


fig. 4

Au temps t, la réaction est arrêtée par addition de 1 ml du mélange suivant : TCA 10 %, oAB 0,5 % en solution dans l'éthanol. On laisse se développer la coloration à température ordinaire pendant 30 mn environ, on élimine par centrifugation les protéines précipitées, et on lit la densité optique du surnageant à 430 mμ.

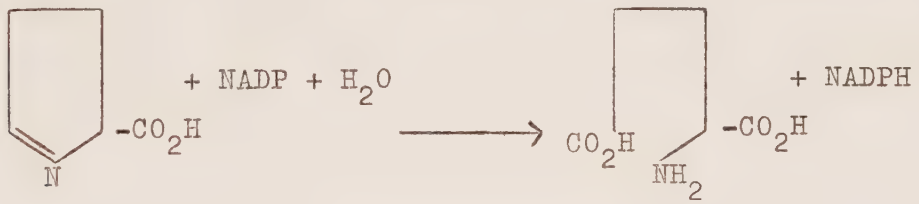
Dans ces conditions, l'accumulation de PCA est linéaire pendant plus de 15 mn, et, pour un temps donné, elle est proportionnelle à la quantité d'extrait ajoutée (voir fig. 3 et 4).

c/ Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en équivalents de PCA multipliés par 100 formés par heure et par mg de protéines.

4/ Mise en évidence de la PCA-oxydase

La PCA oxydase achève la conversion de la proline en glutamate en permettant l'oxydation du PCA en glutamate, selon :



En principe, il est donc possible d'utiliser la réduction du NADP pour doser l'activité de la PCA oxydase. Pourtant, nous n'avons pas réussi à mettre au point un dosage satisfaisant : dans un milieu réactionnel contenant un extrait brut dialysé, le NADP et le PCA, on observe une lente oxydation du NADP qui s'arrête bien avant que tout le NADP présent ait été consommé. L'addition d'une nouvelle quantité de NADP dans le milieu permet à la réaction de repartir. En revanche, la réaction peut être suivie pendant un temps beaucoup plus long si, au lieu de PCA, on donne la proline comme substrat. Après un temps de latence initial

Fig. 5 - Réduction du NADP par un extrait d'E.coli en présence (O) et en l'absence (●) de PCA.
(Détection de la PCA-oxydase. Pour les conditions voir le texte).

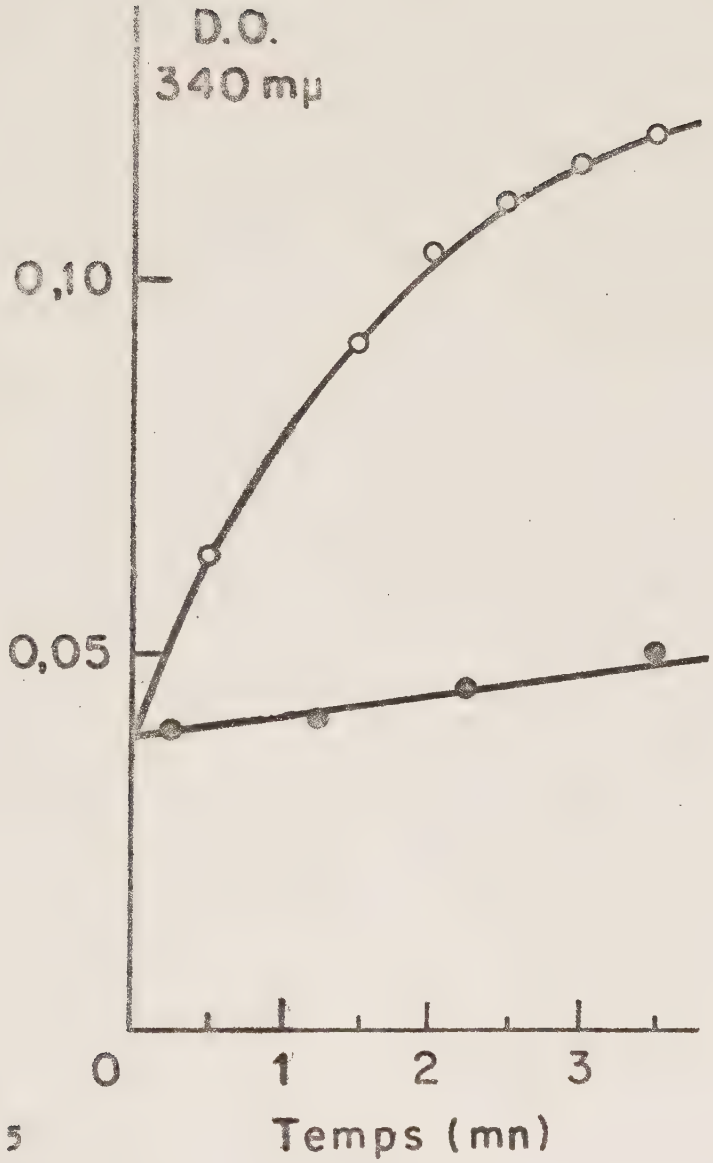


FIG. 5

correspondant sans doute à la fabrication de PCA, à partir de la proline et sous l'action de la proline-oxydase présente dans l'extrait brut, la réduction du NADP se développe de façon linéaire pendant au moins 10 minutes. Il se pourrait que l'échec que nous avons rencontré dans la mise au point d'un dosage satisfaisant de la PCA oxydase, tienne, pour une part au moins, à la qualité du PCA que nous avons préparé.

Quoi qu'il en soit, nous avons pu utiliser un test qualitatif qui nous a permis de repérer, sans ambigüité croyons-nous, des mutants dépourvus de PCA-oxydase. Pour cela, un extrait brut était préparé et dialysé dans des conditions identiques à celles utilisées lorsqu'il s'agissait de doser la proline-oxydase. Pour déterminer si cet extrait était capable de réduire le NADP en présence de PCA, on incubait, dans 3 ml de tampon Tris 10^{-2} M, Mg^{++} 10^{-2}M, pH 8, 0,3 mg de PCA et 0,3 mg de NADP et l'extrait dilué.

On suivait l'éventuelle réduction du NADP par l'évolution de la densité optique du mélange à 340 mμ. Une cuve contenant le même mélange mais sans PCA servait de témoin. La fig. (5) montre l'évolution de la densité optique typiquement observée avec un extrait où la PCA oxydase active était présente.

5/ Dosage des protéines dans un extrait brut

La méthode utilisée était celle du biuret (48).

C - TECHNIQUES GENETIQUES

1/ Mutagenèse

La plupart des mutants que nous avons isolés l'ont été après traitement à l'éthylméthanesulfonate ou à la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.

a/ Mutagenèse à l'éthylméthane sulfonate (EMS)

5 ml d'une culture en phase exponentielle sont centrifugés. Le culot bactérien est lavé et remis en suspension dans 2,5 ml de milieu 63. On ajoute à la suspension 50 µl ou 100 µl, selon les cas, d'EMS et on incube à 37° C pendant deux heures, en agitant de temps en temps de manière à éviter que l'agent mutagène se rassemble au fond du tube. Après deux heures d'incubation, la suspension bactérienne est centrifugée et lavée soigneusement dans 5 ml de milieu 63. Après lavage, les bactéries sont remises en suspension en milieu 63 et mises à croître dans un milieu convenable, à raison d'environ 10^8 bactéries par millilitre de culture au moment de l'ensemencement.

b/ Mutagenèse à la nitrosoguanidine

Pour l'essentiel, les conditions utilisées étaient celles mises au point par Adelberg et al. (20). Les bactéries, provenant d'une culture en phase de croissance exponentielle, sont lavées et remises en suspension dans un tampon Tris $\frac{M}{20}$, Maléate $\frac{M}{20}$, pH 6 et la nitrosoguanidine est ajoutée à une concentration finale variant entre 0,5 et 1 mg/ml. Après une heure d'incubation à 37° C, les bactéries sont centrifugées et lavées soigneusement en milieu 63, puis mises à croître dans un milieu de culture convenable.

2/ Sélection de mutants auxotrophes pour la proline

Les mutants auxotrophes pour la proline ont été sélectionnés par action de la pénicilline dans les conditions suivantes :

Une culture provenant de bactéries soumises à l'action d'un mutagène et où les mutations auxotrophes pour la proline, récessives, ont pu ségréger, est utilisée pour ensemencer, au soir, un milieu minimal additionné de glucose comme source de carbone et de proline. Le lendemain matin, la culture (5 ml) est centrifugée, lavée en milieu 63, et réensemencée en milieu minimal pourvu de glucose, mais non de proline, de façon à avoir de 5.10^8 à 10^9 bactéries par ml.

Après 1 heure d'agitation à 37° C, on ajoute la pénicilline à raison de 2000 unités/ml dans le mélange final. La culture est agitée continuellement à 37° C. Après 90 mn d'exposition à la pénicilline, on vérifie qu'une lyse importante s'est produite dans la culture qui est alors centrifugée et lavée soigneusement en milieu 63. La totalité du culot bactérien récupéré après lavage est utilisée pour ensemencer au soir 5 ml de milieu minimal + glucose + proline. Le lendemain, un deuxième traitement à la pénicilline est pratiqué à partir de cette culture dans des conditions identiques à celles de la veille. Les bactéries récupérées, après lavage en milieu 63 à l'issue de ce deuxième traitement sont remises à croître en présence de proline et à partir de là, les mutants auxotrophes sont cherchés par étalement sur milieu gélosé complet et répliques sur milieu gélosé minimal additionné ou non de proline. L'efficacité de la sélection ainsi pratiquée s'est révélée très élevée, et dans certains cas, près de 100 % des colonies étalées sur milieu gélosé complet après 2 passages successifs à la pénicilline étaient auxotrophes pour la proline.

3/ Croisements bactériens

a/ Croisements non interrompus

Les souches à croiser sont mises à croître en milieu riche, puis mélangées, alors qu'elles sont en phase de croissance exponentielle à raison de 1 bactérie Hfr pour 19 bactéries F^-, ou s'il s'agit d'un croisement F' x F^-, à raison de 1 bactérie F^- pour 9 bactéries F'. La densité bactérienne du mélange est ajustée approximativement à 5.10^8 bactéries par millilitre.

Le mélange est incubé, sans agitation, à 37° C pendant 45 minutes s'il s'agit d'un croisement F' x F^-, et, dans le cas d'un croisement Hfr x F^-, pendant un temps variable fonction de la nature des recombinants qu'on se propose de sélectionner : 45 à 60 mn si les recombinants correspondent à des marqueurs injectés très tôt par la souche Hfr, 120 mn à 150 mn s'il s'agit de marqueurs très tardifs.

Après incubation, le mélange bactérien est dilué de façon convenable en milieu 63 et étalé sur milieu gélosé sélectif.

b/ Croisements interrompus à temps variable

Le mélange bactérien (1 bactérie Hfr pour 19 bactéries F^-) est mis à incuber à 37° C et agité très doucement. A temps variable, on prélève 0,5 ml du mélange qu'on dépose dans 4,5 ml de milieu 63 additionné de streptomycine (500 µg/ml), et agite aussitôt, vigoureusement, pendant 1 minute.

Les étalements des différentes dilutions réalisées à temps variable sont effectués en bloc quand tous les prélèvements ont été réalisés. La présence de streptomycine dans le milieu de dilution contribue à prévenir toute nouvelle conjugaison pendant le temps qui sépare l'interruption du croisement de l'étalement sur milieu sélectif.

4/ Transduction

Toutes les transductions que nous avons effectuées l'ont été à l'aide du phage P_1 (mutant virulent aimablement fourni par M. Hofnung).

a/ Stocks de phage

Des boites de milieu riche contenant de la gélose à 12 g/litre sont préparées et ensemencées quelques heures plus tard, au soir, avec un mélange de bactéries (environ 10^9) et de phages (10^6 à 10^7 particules) préalablement incubé pendant 15 mn, à 25° C en milieu riche liquide, et en présence de chlorure de calcium 2.10^{-3}M. Les boites sont mises pendant une nuit à 37° C. Au matin, on répand quelques gouttes chloroforme à la surface de la gélose et, après dix minutes d'exposition au chloroforme, la souche superficielle de gélose, qui contient le phage, est récoltée, mise en suspension dans quelques millilitres de milieu riche, et centrifugée 10 mn à 5000 g. Le surnageant est conservé à 4° C en présence de chloroforme, et constitue le stock de phage.

b/ Transduction

La souche à transduire est mise à croître en milieu riche en présence de chlorure de calcium 2.10^{-3}M.A 0,25 ml de la culture contenant au moins 10^9 bactéries par millilitre, on ajoute, dans une série de tubes, 0,1 ml et 0,25 ml du stock de phage dilué au dixième, et 0,1 ml et 0,25 ml du stock pur.

Le mélange est incubé pendant 15 à 25 mn à 25° C, puis étalé sur milieu sélectif approprié. A la gélose utilisée pour faire l'étalement en surcouche, on ajoute 0,3 ml de citrate de sodium stérile à 25 g/litre, destiné à éliminer les ions Ca^{++};

Dans quelques cas, au lieu d'étaler directement le mélange phages+bactéries, on lavait les bactéries dans 5 ml de solution physiologique (chlorure de sodium à 9g/l). La suspension était centrifugée et le culot bactérien remis en suspension dans 0,25 ml de liquide physiologique, puis étalé. On évitait ainsi toute croissance résiduelle due à la présence de métabolites dans le petit volume de culture utilisé.

Comme témoin, on utilisait à chaque fois, 0,25 ml de culture bactérienne traitée de la même façon que ci-dessus, mais n'ayant jamais été mise en contact avec le phage. La stérilité du stock de phage était vérifiée par étalement sur milieu riche.

5/ Principales souches utilisées

On trouvera dans le tableau suivant des indications sur la plupart des souches mentionnées dans le texte.

On notera que :

1/ Toutes ces souches exigent, pour croître, la présence de vitamine B1.

2/ Les symboles utilisés sont ceux employés par Taylor et Trotter (49), à l'exception de : - poaA, employé ici pour désigner un locus où des mutations entraînent l'inaptitude à synthétiser une proline-oxydase ou une PCA-oxydase active (cf chapitre IV),
- de R^-, qui désigne une mutation entraînant l'excrétion de proline (cf chapitre V).
- et de poaR, locus où des mutations entraînent la synthèse constitutive de proline-oxydase (cf chapitre IV).

Nous remercions le Dr R.Curtiss III pour les souches qu'il nous a très obligeamment communiquées.

SOUCHE	CARACTERES	ORIGINE
G 1	Hfr ; poaR	mutant NG de l'HfrH
G 4	leu pro A pur E trp lys A met str A/F pro A lac+	croisement χ 462 x E5014 Segrégant pro−
G 5	thr leu pro B lac_{y1} str A/F pro B lac+	croisement G13 x E5014 Segrégant pro−
G 6	F− thr leu pro A lac_{y1} str A	mutant NG de 2001 c
G 7	F− thr leu pro A R− lac_{y1} str A	"
G 8	F− thr leu pro A lac_{y1} str A	"
G 9	"	
G 10	"	
G 11	F− thr leu pro B lac_{y1} str A	"
G 12	"	"
G 13	"	"
G 14	"	"
G 15	F− thr leu pro C lac_{y1} str A	"
G 16	"	"
G 17	"	"
G 18	"	"
G 19	F− pur E glt A poaA his lac_{y1} str A	mutant NG d'un recombinant PA 625 x Hfr P10
G 20	"	"
G 21	F− pur E glt A poaA arg A lac_z str A	recombinant G20 x Hfr H x 29 (collection F.Jacob)
G 22	F− thr leu pro C lac_{y1} str A	mutant NG de 2001 c
G 23	"	
G 24	"	
G 25	"	
G 26	"	
G 27	F− pro C pur E gltA poaA argA lac_z strA	mutant EMS de G 21

SOUCHE	CARACTERES	ORIGINE
G 28	F^- thr leu R^- proC str A	recombinant G 15 x G 36
G 29	"	recombinant G 15 x G 35
G 30	"	recombinant G 15 x G 37
G 31	"	recombinant G 15 x G 40
G 32	"	recombinant G 17 x G 40
G 33	"	recombinant G 17 x G 36
G 34	F^- leu R^- proC pur E trp str A	recombinant AB 2345 x G39
G 35	Hfr ; R^-	mutant NG de l'Hfr H ; résistant au ThCA
G 36	"	"
G 37	"	"
G 38	"	"
G 39	"	"
G 40	"	mutant NG de l'HfrH ; résistant au AzCA
G 42	"	mutant spontané de l'HfrH; résistant au AzCA
G 43	"	transduction P_1 (G7) $\longrightarrow$ HfrCYA 118 (collection F. Jacob)
G 47	F^- pur E glt A poaA his lac_{y1} strA	cf G 19
G 50	F^- leu pur E trp lac_z strA	recombinant AB2345 x Hfr OR 21
G 50 - 68	F^- leu pro C pur E trp lac_z str A	mutant EMS de G 50
G 50 - 711	"	"
G 50 - 154	"	"
G 50 - 169	"	"
G 50 -1710	"	"
G 50 -1181	"	"
G 51	F^-pro C glt A poa A arg A str A	recombinant G21 x Hfr CYA 119 (F.Jacob)
G 52	F^-pro C glt A poa A arg A str A	recombinant G21 x Hfr CYA 221 (F.Jacob)
G 53	F^-pro C poaA arg A str A	recombinant G21 x Hfr Cx 6 (F.Jacob)

SOUCHE	CARACTERES	ORIGINE
G 60 à G 100	Hfr ; met R^-	mutants EMS, résistants au ThCA de l'Hfr P4x.
G 101	F^- pro B pur E glt A poaA argA lac_{y1} str A	mutant EMS de G 21
G 103	F^- pro A "	"
G 105	F^- pro A "	"
G 106	F^- pro B "	"
G 269	F^- leu pro C trp str A	croisement G 50 x mutant EMS proC de l'Hfr OR 21 (Curtiss)
G 371	Hfr ; pro A R^-	mutant EMS de G 37
G 372	"	"
G 373	"	"
G 375	"	"
G 377	Hfr ; pro B R^-	"
G 378	"	"
G 379	"	"
G 21 - 371 à G 21 - 379	F^- pro A ou pro B, R^- glt A poa A arg A str A	recombinant G21 x G371 à G379
G 401 à G 407	Hfr (sauf G 405 : F^+)-pro^- ; synthèse constitutive de proline-oxydase	mutant EMS de l'Hfr OR 21 (Curtiss)
G 408 à G 412	Hfr- synthèse constitutive de proline-oxydase	mutant EMS de l'Hfr OR 21
G 430	F^- thr leu proC lac_{y1} strA	mutant NG de 2001 c
G 431	F^- thr leu R^- proC str A	croisement G 430 x G 37
G 432	"	croisement G 16 x G 37
G 433	"	croisement G 25 x G 37
G 434	F^- R^- proC glt A poa A arg A strA	croisement G27 x G 37

SOUCHE	CARACTERES	ORIGINE
X 462	F^- leu proA pur E trp lys A met str A ara lac xyl mtl	R. Curtiss III
X 474	id sauf : pro B	"
X 478	id sauf : pro C	"
X 277	F^- thr leu pro C lac_{y1} str A	R. Curtiss III
X 278	id sauf pro B	"
X 680	id sauf pro A	"
Hfr OR 21	Hfr	R. Curtiss III
2001 c	F^- thr leu lac_{y1} str A	F. Jacob
3000 x111	Hfr ; délétion lac - pro B - pro A	"
Hfr CYA 119	Hfr ; pro C	"
Hfr CYA 221	"	"
Hfr Cx6	"	"
PA 417	F^- pro A his arg lac_{y1} str A	F. Jacob
AB 1450	F^- arg his ilv met E xyl mal lac str A	E. Adelberg
AB 2345	F^- leu proc trp lac gel mlt xyl ara str A	E. Adelberg
EM 3000	F^- cys C pur F arg F str A	collection F. Jacob
MRW 41	F^- thr leu ser A lys A str A dépourvue d'endonucléase I)	M. Wright

D - TEST D'EXCRÉTION DE LA PROLINE

On utilise comme souche indicatrice une souche porteuse d'une mutation ProC, capable par conséquent de croître sur un milieu additionné de proline, mais non sur un milieu additionné du seul PCA. Pratiquement, divers mutants ProC ont été utilisés. Tous ont donné les mêmes résultats. Quelques cm^3 d'une culture, effectuée en milieu complet, du mutant ProC choisi sont centrifugés ; les cellules sont lavés dans un peu de milieu 63, et remises en suspension dans le même milieu.

On ensemence alors, avec ces bactéries indicatrices réparties uniformément dans une couche de gélose, à raison de 10^7 bactéries par boîte, (une trop grande concentration de bactéries nuit à la clarté du test) des boîtes de Petri renfermant un milieu nutritif minimal, doté de tous les métabolites nécessaires à la croissance de la souche indicatrice et de la souche qu'il s'agira de tester, à l'exception toutefois de la proline. Lorsque la surcouche de gélose est refroidie et solidifiée, on y pratique de petites stries à l'aide d'un fil de platine trempé dans une colonie de la souche à tester.

La boîte est mise à incuber à 37° C pendant une nuit (dans quelques cas, une incubation de 36 heures était nécessaire) ; au bout de ce temps, une souche qui n'excrète pas de proline a formé des stries aux bords bien nets, aux environs desquels on ne décèle pas, à l'examen microscopique, de microcolonies de la souche indicatrice. Au contraire, une souche excrétrice de proline forme des stries qui paraissent à l'oeil nu entourées d'un halo lactescent, lequel se résout à l'examen microscopique, en un grand nombre de microcolonies provenant de la souche indicatrice.

Dans certains cas, il n'est pas nécessaire de disposer en stries la souche à tester. Supposons par exemple qu'on ait transduit une souche pro^- à l'aide d'un phage provenant d'une souche excrétrice de proline. On veut savoir si la mutation qui se manifeste par l'excrétion de proline est cotransductible avec la mutation pro^- de la souche réceptrice. Si un transductant pro^+ reçoit en même temps l'allèle "excréteur de proline", il forme une colonie qui excrète de la proline, donc qui permet à la souche réceptrice de croître dans le voisinage de la colonie. Celle-ci apparait alors entourée d'un halo caracteristique. Il est ainsi aisé de dénombrer, sur une boîte de tranduction, la fraction des tranduits pro^+ qui ont aussi reçu l'allèle "excréteur de proline".

E - TEST DE CONSTITUTIVITE POUR LA PROLINE-OXYDASE

En dépit d'efforts répétés, nous n'avons pu mettre au point un test rapide permettant de déceler sur boîte de Petri des colonies synthétisant constitutivement la proline-oxydase. On est limité en particulier par la sensibilité de la réaction colorée que fournit l'o-aminobenzaldéhyde avec le PCA et seuls des mutants très hautement constitutifs donnent une coloration jaune quand on vaporise sur des colonies mises à croître en l'absence de proline un mélange de proline et d'o-aminobenzaldéhyde.

Nous avons donc utilisé la technique suivante :

Une souche à tester est mise en culture dans 5 ml de milieu minimal dépourvu de proline, en présence de glycérol comme source de carbone. Après une nuit de croissance, les bactéries sont centrifugées, lavées et remises en suspension dans 2 ml de tampon Tris 10^{-2}M, Mg Cl_2 10^{-2}M et soumises à l'action d'un sonicateur pendant 20 à 30 secondes. A l'extrait brut obtenu on ajoute 1 ml d'une solution de proline 10^{-1}M et d'o-aminobenzaldéhyde à 3mg/ml. Le mélange est incubé à 37° C avec agitation pendant 15 minutes environ. Aucune coloration ne se développe dans ces conditions avec une souche sauvage. Un mutant constitutif est au contraire répéré par la franche coloration jaune qu'il fournit.

F - PRODUITS CHIMIQUES

1/ Préparation du PCA

Le PCA a été préparé selon la méthode de Strecker (21), à partir du γ,γ-dicarbéthoxy-γ-acétamidobutyraldéhyde. Nous remercions Monsieur le Professeur E. Bricas, sous la direction de qui cette synthèse a été réalisée, pour l'hospitalité qu'il nous a accordée dans son laboratoire à cette occasion. Le produit obtenu, purifié par chromatographie sur une colonne de Dowex 50-x4, présentait, après chromatographie sur papier dans un solvant butanol-acide acétique-eau (6-2-2), trois taches :

- l'une, prépondérante, avait les propriétés du PCA,
- une autre, minoritaire, a pu être identifiée à la glycine,
- une troisième, faiblement présente, était de nature inconnue.

Le produit a été conservé dans un dessicateur à anhydride phosphorique, sous vide, à 4° C.

2/ Autres produits

La 3-4 déhydroproline était un don du Dr B. Witkop, que nous remercions.

Tous les autres produits étaient obtenus dans le commerce.

La L-proline était un produit de chez Calbiochem, l'o-aminobenzaldéhyde un produit de chez Fluka.

CHAPITRE III

PRINCIPAUX TYPES DE MUTANTS

Nous examinerons dans ce chapitre les principales catégories de mutants que l'on a rencontrés dans l'étude du système de la proline. Pour ce qui concerne la voie de biosynthèse, seuls les mutants auxotrophes (pro^-) seront considérés ici, l'étude de mutants de régulation de cette voie étant reportée au chapitre V. Le principal problème qui sera discuté à propos de ces mutants auxotrophes est celui de la distinction de deux classes de mutants, pro A et pro B, parmi ceux dont la mutation est localisée entre les marqueurs thr-leu et lac sur la carte chromosomique d'E.coli K 12. Cette distinction est assez récente (cf Curtis (22 et 23)) et nous avons été amené à la reprendre à partir de tests de complémentation qui n'avaient pas encore été effectués.

D'autre part, seront décrites l'obtention et quelques propriétés de mutants de la voie de dégradation : mutants affectant la structure des enzymes de cette voie, et aussi sa régulation. De tels mutants n'avaient, à notre connaissance, pas encore été décrits. Indépendamment de ce fait, leur recherche a paru indispensable pour pouvoir déceler d'éventuelles relations régulatrices entre les voies anabolique et catabolique.

A - MUTANTS AUXOTROPHES POUR LA PROLINE.

1/ Classification en fonction des exigences nutritionnelles

Les sélections, opérées à l'aide de la pénicilline selon la technique décrite dans la section Matériel et Méthodes, de mutants auxotrophes pour la proline livrent des souches qu'il est en général aisé de ranger dans l'une ou l'autre de trois classes définies par l'aptitude à croître sur différents milieux, comme l'indique le tableau 2.

2/ Mutants de la classe 1

En fait, les mutants de la classe 1, déjà reconnus par Demerec et al. (24) n'intéressent pas la voie de biosynthèse de la proline. Ils peuvent être

CLASSE	CROISSANCE SUR MILIEU MINIMAL GLUCOSE ADDITIONNE DE			LOCALISATION GENETIQUE
	GLUTAMATE	PCA	PROLINE	
1	+	+	+	Glt A ...
2	-	+	+	Pro A Pro B
3	-	-	+	Pro C

Tableau 2 - Classification des mutants auxotrophes pour la proline en fonction des exigences nutritionnelles.

porteurs de mutations très variées mais qui toutes ont pour effet de bloquer le fonctionnement du cycle de Krebs. Outre le glutamate et la proline, une variété de métabolites, appartenant à ce cycle ou proches dérivés de métabolites lui appartenant, est capable de satisfaire leur exigence nutritionnelle : succinate, aspartate, etc. La souche PA 625 qui appartient à cette classe, a par exemple, été reconnue porteuse d'une mutation affectant la citrate-synthétase. (25)

L'aptitude de ces souches à croître sur milieu minimal additionné de proline s'explique par le fait que, dans ces conditions, la synthèse de proline-oxydase et de PCA-oxydase est induite et l'acide aminé est oxydé en glutamate qui permet au cycle de Krebs de fonctionner. Sur milieu minimal solide, la proline ajoutée à la concentration 5.10^{-6}M suffit à une croissance "normale" (entendons par là que les colonies apparaissent et se développent à 37° C -dans un délai de 36 à 48 h-) d'un mutant de la classe 1. Dès lors, l'introduction chez un tel mutant d'une mutation supplémentaire affectant l'un ou l'autre des enzymes de la voie de dégradation de la proline, fait que ce mutant, s'il est toujours capable de croître en présence de glutamate, ne croît plus sur milieu minimal additionné de proline. Nous verrons le parti qu'on peut tirer de ceci pour isoler des mutants de la voie de dégradation.

Dans les sélections de mutants pro^- que nous avons effectuées à partir de souches "sauvages", ou ne portant aucune mutation qui touchât, d'une façon quelconque, le système de la proline, nous avons constaté que les mutants de cette classe apparaissaient avec une faible fréquence, de l'ordre de 1 %, parmi des mutants appartenant le plus souvent aux classes 2 et 3. En revanche, il est apparu que de tels mutants étaient très abondants dans des sélections d'auxotrophes faites à partir de souches dotées d'une mutation qui entraînait l'excrétion de proline dans le milieu extérieur (voir chapitre V). Ainsi parmi 32 mutants indépendants auxotrophes pour la proline, obtenus à partir des souches excrétrices de proline G 35, G 36, G 38, G 39, G 40, G 42, G 43, 21 appartenaient aux classes 2 ou 3, 11 (soit 33 %) pouvaient être rangés dans la classe 1. Nous ne voyons du reste pas d'explication à proposer pour cette variation de fréquence dans les 2 types de sélection.

3/ Identification des mutants des classes 2 et 3

Examinons maintenant les mutants qui altèrent spécifiquement la voie de biosynthèse de la proline, savoir les mutants des classes 2 et 3. Ces deux classes, distinctes par leurs exigences nutritionnelles, le sont aussi par la localisation génétique des mutations correspondantes. Deux souches Hfr, l'HfrP4x6 et l'HfrOR21, qui ont sur la carte chromosomique d'E.coli K 12 des origines très voisines mais qui injectent les marqueurs génétiques en sens inverses (voir fig. 6), peuvent être utilisées pour effectuer cette distinction : les mutants de la classe 2 fournissent avec l'HfrP4x6 des recombinants précoces alors que les mutations de la classe 3 correspondent à un marqueur injecté très tardivement par cet Hfr ; la situation est inverse avec l'HfrOR21 qui fournit des recombinants précoces avec les mutants de la classe 3, des recombinants très tardifs avec ceux de la classe 2. Par ailleurs, une souche F' (E5014) isolée par le Dr Signer que nous remercions de l'avoir aimablement mise à notre disposition, est disponible, qui complémente les mutants de la région lac et les mutants pro$^-$ de la classe 2, mais non ceux de la classe 3. De même, diverses souches F' de la collection F. Jacob complémentent les mutants de la région lac et les mutants pro$^-$ de la classe 3, mais non ceux de la classe 2. Nous avons couramment utilisé la souche RV113, parmi les diverses souches F' de ce type qui étaient disponibles. La figure 6 symbolise les structures génétiques de ces diverses souches Hfr et F' qui permettent d'identifier, à partir cette fois de tests génétiques, les mutants des classes 2 et 3. Le tableau 3 résume les complémentations des différentes classes de mutants pro$^-$ par les deux souches F'.

A de rares exceptions près, sur lesquelles nous reviendrons plus loin, tous les mutants pro$^-$ que nous avons manipulé (environ 700) ont été identifiables par ces tests génétiques, en particulier, tout mutant pro$^-$ au sens strict (c'est-à-dire n'appartenant pas à la classe 1, mais à l'une ou l'autre des classes 2 et 3) s'est avéré complémentable par l'épisome de l'une ou l'autre des souches E5014 et RV 113, jamais nous n'avons trouvé de mutant qui ne fût complémentable ni par l'un ni par l'autre F', jamais nous n'en avons trouvé qui fût complémentable par les deux simultanément. (1)

(1) La souche RV113, croisée avec un mutant de la classe 2 fournit un taux assez élevé (quelques % par rapport au nombre de bactéries de la souche limitante) de recombinants pro$^+$, dû à un transfert de marqueurs chromosomiques. Un test de retransfert d'épisome par ces recombinants permet de distinguer ce cas de celui où l'on a affaire

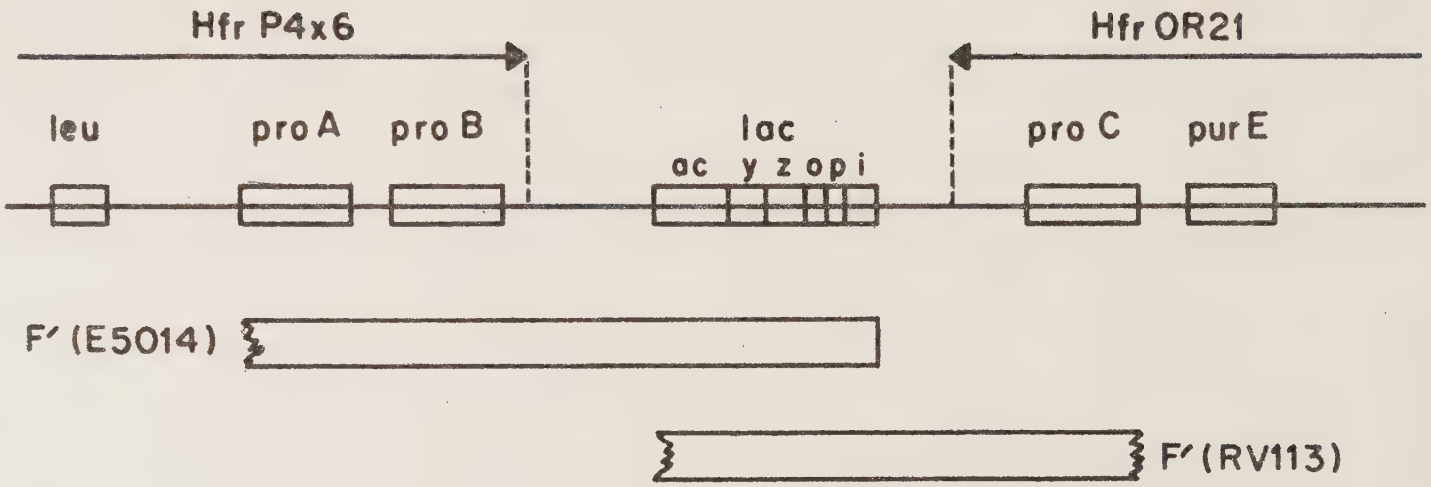


FIG. 6 - Structure génétique de la région lac-pro
chez E.coli K12

MUTANT DE LA CLASSE	COMPLEMENTATION PAR L'EPISOME DE LA SOUCHE	
	E5014	RV113
1	-	-
2	+	-
3	-	+

Tableau 3 - Complémentation des mutants auxotrophes pour la proline des différentes classes par deux souches F' : E5014 et RV113.

Les quelques exceptions apparentes à cette règle que nous avons rencontrées avec une fréquence de l'ordre de 0,5 % dans des sélections de mutants issus d'une mutagenèse à la nitrosoguanidine ou à l'éthylméthanesulfonate, étaient constituées en réalité par des doubles mutants, complémentables ni par l'un ni par l'autre des deux souches F'. Les souches G46, G50-71 et G50-118 sont dans ce cas. Nous n'avons pas vérifié que ces souches deviennent pro^+ après introduction des deux F' (la construction de souches porteuses de deux épisomes est assez délicate, et, dans ce cas particulier, nous ne disposions pas de marqueurs adéquats pour la réaliser).En revanche, nous avons effectué l'expérience suivante. On fait le croisement :

HfrP4x6	x	G50-71
(leu^+ pro^+ str^s)		(leu^- pro^- str^r)

On sélectionne, en présence de proline, les recombinants leu^+ str^r. 4 recombinants leu^+ str^r, tous pro^-, sont croisés avec la souche RV113. 3 sont toujours non complémentables par l'épisome de cette souche, 1 est devenu complémentable.

Nous interprétions cette expérience ainsi : parmi les recombinants leu^+ str^r obtenus dans le croisement avec l'HfrP4x6, certains ont intégré la région pro^+ injectée précocement pour cet Hfr ; ces recombinants ne sont plus alors porteurs que d'une mutation pro^-, localisée dans la région injectée en queue par l'HfrP4x6. Ce sont des mutants pro^- simples, complémentables par l'épisome de la souche RV113.

La même analyse a pu être pratiquée avec les souches G46 et G50-118 et nous considérerons donc qu'elles ne contreviennent pas réellement aux règles de complémentation énoncées.

Sur la base des réponses de croissance présentées par les mutants pro^- à l'égard de la proline et du PCA, les mutants de la classe 2 doivent être considérés comme synthétisant une PCA réductase active, alors que l'activité PCA synthétase est chez eux abolie. Ceux de la classe 3 doivent, de la même manière, avoir

perdu l'activité PCA réductase. Mais le tableau des exigences nutritionnelles n'implique rien sur l'activité, chez eux, de la PCA synthétase. Il a été vérifié que l'activité PCA réductase des mutants de la classe 2 est très comparable à celle qu'on trouve dans une souche pro^+ sauvage, alors qu'elle a disparu chez tous les mutants de la classe 3 que nous avons examinés. Mais nous reviendrons plus en détail sur ces propriétés enzymologiques au cours du chapitre IV.

On doit remarquer qu'aucun des mutants pro^- (classes 2 et 3) que nous avons isolés ne semble avoir de mutation qui interfère en quelque façon avec le métabolisme de l'arginine (voir chapitre I). En fait, les sélections de mutants que nous avons effectuées l'étaient de telle façon que des mutants présentant une double exigence nutritionnelle (proline et arginine par exemple) ne pouvaient apparaître (avant le passage à la pénicilline, les cultures de clones mutagénisés étaient faites, en milieu minimal, en présence de la seule proline). A supposer qu'elles existent, il est donc normal que nous n'ayons pas décelé de mutations affectant une chaîne métabolique commune à la biosynthèse de deux acides aminés. Mais, réciproquement, il ne paraît pas qu'aucun de nos mutants témoigne de l'existence d'une voie de biosynthèse de la proline chez E.coli K12 qui partirait de l'arginine, comme cela est le cas chez Tetrahymena sp (15). Nous avons en particulier examiné la croissance sur milieu minimal additionné d'ornithine des mutants des classes 2 et 3. Nous n'avons jamais obtenu de réponse positive.

4/ Classification des mutants de la classe 2.

a/ Critères d'identification des mutations pro A et pro B

L'existence de mutations pro^- localisées à proximité des mutations lac^-, de part et d'autre de celles-ci, a été reconnue depuis longtemps (26), (50). Aux deux locus correspondants avaient été attribuées les désignations suivantes : pro A , pour les mutations situées entre les locus lac et thr-leu ;
pro B , pour les mutations localisées entre lac et pur E.
Comme il a été dit, ces deux groupes correspondent respectivement aux mutants pro^- des classes 2 et 3 dont il a été question jusqu'à présent.

Or Curtiss (22) a mis en évidence assez récemment le fait que les mutations jusque là rassemblées dans le locus pro A pouvaient en fait être rangées dans l'un ou l'autre de deux groupes, distingués sur la base des critères génétiques suivants :

- certaines mutations pro$^-$ de cette région sont cotransductibles, à une fréquence du reste assez faible, de l'ordre de 5 %, avec les mutations de la région lac, alors que d'autres mutations pro A ne fournissent aucune cotransduction de ce type à un niveau détectable.

- des expériences de croisements interrompus à temps variables permettent de discerner deux marqueurs pro$^-$, séparés sur le chromosome par une distance suffisante pour entraîner une différence dans les temps d'entrée, de l'ordre de 90 secondes.

Curtiss a donc proposé la distinction des locus pro A et pro B, à l'intérieur de ce qui jusque là était l'unique locus pro A, l'ancien locus pro B prenant désormais la désignation pro C (voir fig. 6).

Nous avions donc à rechercher si les mutants pro$^-$ de la classe 2 que nous obtenions étaient bien rangeables en ces deux groupes. Des deux critères génétiques utilisés par Curtiss, le second, qui fait appel à des expériences de croisement interrompu, était d'un maniement délicat : une différence de temps d'entrée de l'ordre de la minute est à la limite des possibilités de résolution de ce système expérimental, on peut même douter qu'elle puisse jamais être distinguée de façon significative, à moins que les deux mutations qu'il s'agit de séparer, ne soient portées sur une même structure génétique, et qu'on puisse, au cours d'un unique croisement, sélectionner séparément les recombinants pour l'une ou l'autre de ces mutations. Mais c'est ce qui était impossible ici puisque, à supposer qu'on dispose d'un double mutant pro A$^-$ pro B$^-$, on ne sait pas sélectionner séparément des individus pro A$^+$ pro B$^-$ et pro A$^-$ pro B$^+$, mais seulement des individus pro A$^+$ pro B$^+$.

Par ailleurs, des expériences de transduction où nous tentions de voir si certaines mutations de la classe 2 étaient cotransductibles avec une mutation lac^- ont donné des résultats décevants. Les marqueurs lac fournissaient souvent une fréquence de transduits basse, très inférieure à celle des transduits pro^+ ; mais même lorsque nous obtenions une fréquence de transduction convenable pour l'un et l'autre marqueur, nous n'avons jamais mis en évidence une transduction simultanée, sinon de façon occasionnelle et peu reproductible. Aussi avons-nous été amené à rechercher un autre critère pour repérer les mutations pro A et pro B. Puisque nous disposions d'un épisome complémentant tous les mutants pro^- de la classe 2, nous avons tenté de voir s'il était possible de mettre en évidence dans cet ensemble deux groupes de complémentation distincts. C'est de la caractérisation de ces groupes de complémentation qu'il va être question maintenant.

b/ Complémentation entre les mutations pro A et pro B.

Dans un premier temps, une souche F' a été isolée, dans laquelle l'épisome est porteur d'une mutation pro A^-, définie comme telle par Curtiss selon les critères décrits. A cette fin, c'est la souche X 462, aimablement procurée par le Dr Curtiss, qui a été utilisée. On faisait le croisement;:

X 462	x	E5014
(F^- pro A^- str^r...)		(str^s/F lac^+ $pro^+_{A,B}$)

Provenant d'un clone recombinant pro^+ str^r dont on avait vérifié qu'il était capable de transférer à haute fréquence les caractères pro^+ et lac^+ (par croisement avec la souche PA 417), 4000 bactéries environ étaient mises à croître sur milieu solide complet. Les colonies résultantes étaient ensuite soumises à la technique des répliques pour déceler l'apparition éventuelle de ségrégants lac^+ pro^-. Ceux-ci apparaissent en effet à la fréquence approximative de 1‰ (5 ségrégants ont été obtenus dans l'expérience ici décrite). Par croisement avec la souche PA 417, on examinait l'aptitude de ces ségrégants à transférer à haute fréquence le caractère lac^+. 3 ségrégants, sur les 5 obtenus, avaient conservé cette capacité de transfert. Il s'agissait donc de clones restés porteurs d'un épisome F toujours doté des gènes de la région lac.

Que le caractère pro^- de ces clones fût dû à une recombinaison entre le chromosome bactérien et l'épisome, avec intégration sur l'épisome de la mutation pro_A^- jusque là portée par le chromosome, et non pas à une perte pure et simple de la région pro par l'épisome, c'est ce qui était suggéré par le fait que tous ces ségrégants étaient capables de fournir des recombinants pro^+ par croisement avec divers autres mutants pro^- de cette région, la fréquence de ces recombinants étant systématiquement inférieure (de 100 à 1000 fois) à la fréquence des recombinants lac^+ obtenus dans le même croisement (voir tableau 4). On pouvait donc vraisemblablement attribuer à ces ségrégants la structure génétique d'un diploïde partiel, homozygote pour la région pro A pro B :

$$\frac{lac^- \ pro\ B^+ \ pro\ A^-}{F\ lac^+ \ \ pro\ B^+ \ \ pro\ A^-}$$

Nous avons donc recherché si dans un ensemble de mutants de la classe 2, tous complémentés par l'épisome de la souche E5014, une partition pouvait être effectuée selon que ces mutants étaient ou non complémentés par l'épisome d'un tel ségrégant. Le tableau 5 montre que tel est bien le cas. On voit en effet que chacun des 9 mutants pro^-, croisé avec la souche porteuse de l'épisome de structure (supposée) F lac^+ pro_B^+ pro A^- (souche G4), fournit soit un taux de "recombinants" de 100 à 1000 fois inférieur à celui obtenu dans un croisement avec la souche porteuse de l'épisome F lac^+ pro_B^+ pro A^+, soit un taux équivalent. Dans ce dernier cas, qu'on fût bien en présence d'un phénomène de complémentation était confirmé par le fait que les clones pro^+ obtenus étaient capables de retransférer à haute fréquence le caractère lac^+ à une souche F^- lac^-. Ces clones étaient donc bien des mérozygotes dans lesquels, selon toute vraisemblance, avait lieu une complémentation entre une région proline portée par l'épisome et du type pro_A^- pro B^+, et une région proline portée par le chromosome, du type pro A^+ pro B^-.

Partant cette fois d'un mutant pro^- de la classe 2 (souche G13) complémenté par l'épisome de la souche E5014 et par celui de la souche G4, le travail qui vient d'être décrit à partir de la souche χ 462 a été refait, de manière à isoler une souche dotée d'un épisome du type F lac^+ pro A^+ pro B^-.

CROISEMENT		FREQUENCE DES RECOMBINANTS lac^+ trp^+	FREQUENCE DES RECOMBINANTS pro^+ trp^+
Ségrégant n°1	x X 278	> 10 %	0,06 %
	x X 680	> 10 %	0,01
Ségrégant n°2	x X 278	> 10	0,08
	x X 680	> 10	0,01
Ségrégant n°3	x X 278	> 10	0,08
	x X 680	> 10	0,01
Ségrégant n°4	x X 278	0,07	0,09
	x X 680	0,06	0,03
Ségrégant n°5	x X 278	0,35	0,14
	x X 680	0,30	0,01

Tableau 4 - Isolement d'une souche F' porteuse d'un épisome F lac^+ pro A^-. Les 5 ségrégants auxotrophes pour la proline obtenus à partir du mérodiploïde de structure lac^- pro B^+ pro A^- / F lac^+ pro B^+ pro A^+ (cf le texte) sont examinés pour leur aptitude à transférer le marqueur lac^+ d'une part, pro^+ d'autre part. Les deux souches F^- utilisées sont respectivement porteuses des caractères lac^- pro A^- trp^+ (X 680) et lac^- pro B^- trp^+ (X 278). Les mérodiploïdes sont auxtrophes pour le tryptophane. Les croisements sont effectués dans les conditions décrites (voir Matériel et Méthodes).

F' (/lac^+ $proB^+$ $proA^-$) croisé avec	FREQUENCE DES RECOMBINANTS pro^+ trp^+	GENOTYPE PROBABLE DE LA SOUCHE F^-
G 6	< 0,01 %	pro A
G 7	< 0,01	pro A
G 8	< 0,01	pro A
G 9	≃ 0,01	pro A
G 10	< 0,01	pro A
G 11	10	pro B
G 12	>10	pro B
G 13	10	pro B
G 14	≃ 8	pro B

Tableau 5 - Classement de mutants auxotrophes pour la proline dont la mutation est localisée dans la région pro A - pro B - Chaque mutant est croisé avec un mérodiploïde homozygote pour la mutation pro A de la souche χ462. Pour les caractères de ces souches, voir la table générale (dans Matériels et Méthodes). Croisements effectués dans les conditions ordinaires. Les fréquences des recombinants sont exprimées par rapport au nombre de bactéries de la souche limitante (ici la souche F').

Le tableau 6 montre que la souche G5 obtenue dans ces conditions présente bien les caractéristiques qu'on attend d'une telle souche F' : les mutants pro$^-$ complémentés par l'épisome F lac$^+$ pro B$^+$ pro A$^+$, et non par l'épisome de la souche G4 (F lac$^+$ pro B$^+$ pro A$^-$) sont complémentés par l'épisome de la souche G5 (F lac$^+$ pro B$^-$ pro A$^+$). Réciproquement, les mutants complémentés par la souche G4 ne le sont pas par la souche G5.

D'une manière générale, sur plus de cent mutants complémentés par l'épisome F lac$^+$ pro A$^+$ pro B$^+$ que nous avons examinés aucun n'est apparu complémentable à la fois par G4 et par G5. Il semble donc que cette classe de mutants comporte deux groupes de complémentation, et deux seulement. On notera que les deux cistrons pro A et pro B ainsi définis par des tests de complémentation doivent en principe être identiques aux deux locus pro A et pro B définis par Curtiss sur la base d'autres critères génétiques, puisque les deux groupes de complémentation sont définis à partir d'un mutant classé porteur d'une mutation pro A$^-$ par Curtiss.

L'examen du tableau 6 indique que certains mutants complémentés par l'épisome F lac$^+$ Pro B$^+$ Pro A$^+$ ne le sont pourtant ni par G4 ni par G5. C'est en particulier le cas du mutant χ 278, qui provient de la collection du Dr Curtiss et classé comme pro B$^-$. Deux hypothèses peuvent être invoquées pour expliquer ces cas, soit qu'il s'agisse de doubles mutants pro A$^-$ pro B$^-$, soit qu'on se trouve en présence d'un phénomène de polarité : il faudrait alors imaginer que, les cistrons pro A et pro B formant un unique opéron, certaines mutations de pro B auraient pour effet d'abolir la lecture du cistron pro A, ce qui définirait du même coup le sens de lecture de l'opéron supposé.

Le fait que le mutantχ278 ait pu être classé comme pro B$^-$ par Curtiss, à l'aide notamment d'un test de transduction qui distingue en principe entre les mutants pro A et pro B, également la fréquence "apparente" de réversion spontanée de ce mutant que nous avons trouvée être de l'ordre de 10^{-7}, incite plutôt à rejeter l'hypothèse d'un double mutant.

En revanche, accepter l'idée que les cistrons pro A et pro B constituent un unique opéron implique que ces deux cistrons soient adjacents sur le chromosome. Ce n'est pas ce que suggèrent les résultats de Curtiss, mais nous allons voir que peut-être sur ce point, une remise en question est nécessaire.

SOUCHE F^-	COMPLEMENTATION par G4 (/F lac^+ pro A^-)	COMPLEMENTATION par G5 (/F lac^+ pro B^-)	GENOTYPE DE LA SOUCHE F^-
G 6	–	+	pro A
G 7	–	+	pro A
G 8	–	+	pro A
G 9	–	+	pro A
G 10	–	+	pro A
G 11	+	–	pro B
G 12	+	–	pro B
G 13	+	–	pro B
G 14	+	–	pro B
X 278	–	–	?

Tableau 6 - Complémentation de diverses mutations pro^- par deux épisomes porteurs respectivement de la mutation pro A de X 462 (G4) et pro B de G 13 (G5). Pour déterminer si une mutation est complémentable par l'épisome de la souche G4, par exemple, un croisement est effectué dans les conditions ordinaires. Une fréquence de recombinants pro^+ trp^+ de l'ordre de 10 % est considérée comme indiquant une complémentation effective. Une fréquence de l'ordre de 0,01 % indique qu'il n'y a pas complémentation.

5/ Ordre et proximité des mutations pro A et pro B.

Si, comme on doit le supposer, les deux groupes de complémentation pro A et pro B, tels qu'ils viennent d'être définis, coïncident avec les deux locus du même nom identifiés par Curtiss, on doit avoir, d'après Curtiss, l'ordre suivant sur le chromosome :

Nous avons tenté, sans y parvenir, de mettre en évidence une cotransduction des mutations pro B et lac, qui aurait permis de distinguer ces mutations des mutations pro A, non cotransductibles avec celles de la rógion lac.

Le tableau 7 présente les résultats d'une expérience dans laquelle deux mutants pro A d'une part, deux mutants pro B d'autre part, sont transduits par un phage P_1 provenant d'une souche "sauvage" (HfrH). Deux sélections sont faites indépendamment dans chaque cas, celle des transduits pro^+, celle des transduits lac^+. On fait en outre un étalement sur lactose et en l'absence de proline en vue de déceler d'éventuels doubles transduits. On voit que l'intégration du marqueur lac est dans tous les cas beaucoup moins efficace que celle du marqueur pro. Pourtant, le nombre de transduits lac^+ obtenus est suffisant pour qu'on puisse espérer déceler une cotransduction lac-pro si celle-ci se produisait à une fréquence variant entre 5 et 10 % des transduits présents en quantité limitante, ici les transduits lac^+. En fait il apparaît ici que, si une cotransduction a lieu entre les mutations lac et pro B, celle-ci ne doit pas se produire à une fréquence supérieure à 1 % et, en tout état de cause, ce type d'expérience paraît impuissant à distinguer entre les mutations pro A et pro B.

Nous avons pourtant retrouvé l'ordre indiqué plus haut (thr-leu pro A pro B lac) de la manière suivante. Une sélection de mutants pro^- ayant été pratiquée à partir de la souche G 37 (souche dérivée de l'HfrH), les mutants pro A et pro B obtenus ont été croisés avec la souche 2000x111. Cette souche F^- est dotée d'une délétion qui couvre toute la région lactose et s'étend jusque dans la région proline (côté pro B). Il ne semble pas que cette délétion affecte la région pro C, puisque nous avons pu vérifier que la recombinaison a lieu à un taux normal

SOUCHE RECEPTRICE	GENOTYPE	TRANSDUITS pro^+	TRANSDUITS lac^+	TRANSDUITS lac^+ pro^+
G 101	pro B	1540	105	0
G 103	pro A	762	155	0
G 105	pro A	398	31	0
G 106	pro B	1120	113	0

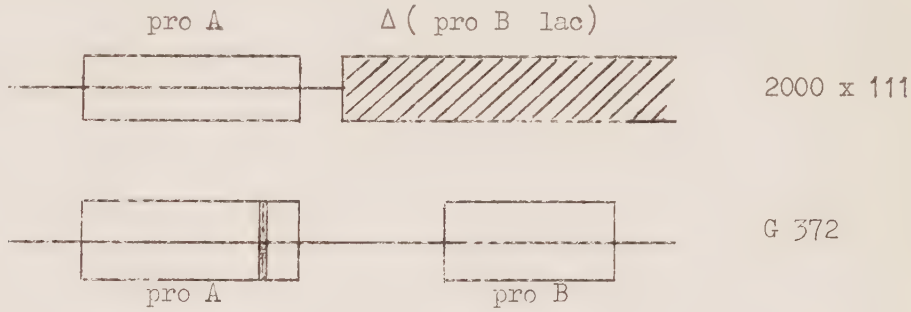
Tableau 7 - Expérience pour déterminer si les marqueurs lac d'une part, pro A ou pro B d'autre part, sont cotransductibles par le phage P_1. Les nombres de transduits indiqués s'entendent pour un même volume d'un même mélange phages-bactéries étalé sur différents milieux sélectifs. 1000 transduits correspondent à une fréquence de transduction approximativement égale à 10^{-5}.

Dans chaque cas, un étalement témoin des bactéries n'ayant pas été en contact avec le phage P_1, mais effectué par ailleurs dans des conditions identiques, ne fournit nulle part aucune colonie, sauf pour la souche G 103 qui donne 100 colonies réverses pro^+.

Pour les conditions de transduction et pour le génotype complet des souches, voir Matériel et Méthodes.

entre cette délétion et les mutants pro C, et que, d'autre part, l'enzyme (PCA réductase) dont le gène pro C est vraisemblablement le gène de structure, est normalement actif dans cette souche.

Le tableau (8), qui consigne les résultats des croisements en question, montre que les trois mutants pro B utilisés ne fournissent aucun recombinant pro^+ avec la délétion lac-pro, alors qu'au contraire, parmi les mutants pro A examinés, deux semblent bien donner un taux substantiel de recombinaison dans les mêmes conditions. Notons qu'un autre mutant pro A (souche G372) donne peut-être des recombinants abortifs ; sur les boîtes de sélection correspondant à ce croisement croissaient en effet seulement des microcolonies bien repérables à la loupe binoculaire, à bords irréguliers et qui ne parvenaient pas à une taille normale. Il pourrait s'agir de bactéries ayant la structure génétique suivante :



L'extrême proximité entre la mutation pro A ponctuelle et l'extrémité de la délétion rendrait la recombinaison très difficile, d'où l'obtention de recombinants abortifs correspondant à des bactéries qui perdent peu à peu le fragment chromosomique apporté par la souche Hfr, grâce auquel avait lieu une complémentation de la région pro A. Les mutants pro A qui donnent de véritables recombinants seraient, dans cette hypothèse, localisés à l'autre extrémité du cistron pro A. On voit du reste que ceci implique que dans la délétion x111, le cistron pro A soit fonctionnel.

En tout cas, ces croisements permettent, semble-t-il, d'ordonner sans ambigüité les cistrons pro A et pro B et l'on retrouve d'ailleurs l'ordre proposé par Curtiss. Subsiste alors la question de savoir si une "grande" distance sépare ces deux cistrons sur le chromosome. Deux expériences apportent à cette question des éléments de réponses :

SOUCHE Hfr	GENOTYPE	FREQUENCE DE RECOMBINAISON avec Δ(x 111)
G 371	pro A	< 0,0001 (% bactéries Hfr)
G 372	pro A	0,002
G 373	pro A	0,01
G 375	pro A	0,03
G 377	pro B	< 0,0001
G 378	pro B	< 0,0001
G 379	pro B	< 0,0001

Tableau 8 - Fréquence de recombinaison de diverses mutations pro A et pro B avec la délétion lac-pro de la souche 2000 x 111. Les croisements sont effectués selon la technique indiquée dans Matériels et Méthodes. Toutefois les boîtes de sélection ont été examinées après 48 heures d'incubation à 37° C, suivie d'une incubation supplémentaire de 72 h. à la température du laboratoire. Les souches Hfr sont des mutants indépendants issus de la souche G37 (voir Matériels et Méthodes). La nature de la mutation pro^- dont elles sont porteuses a été déterminée par complémentation par les souches F' G4 et G5, après qu'on eût, par croisement avec la souche G21, transféré ces mutations pro^- dans une souche F^-.

1/ Nous avons d'abord comparé les cinétiques d'entrée des marqueurs pro (A ou B) et thr-leu dans des croisements interrompus à temps variables avec l'HfrP4x6. Les figures 7 et 8 qui présentent les résultats de tels croisements pour 1 mutant pro A et 1 mutant pro B montrent d'abord que les marqueurs pro A et pro B sont bien, l'un et l'autre, injectés de façon précoce par l'HfrP4x6. Mais en outre, dans un cas comme dans l'autre, on observe une distorsion des cinétiques d'entrée des marqueurs pro (A ou B) et thr-leu : bien que le marqueur thr-leu soit injecté postérieurement aux marqueurs pro, il n'en fournit pas moins un taux de recombinants plus élevé (1). On peut vérifier que ceci n'est pas dû à une propriété spécifique des marqueurs pro qui entraînerait dans tous les cas une mauvaise intégration de la région pro ; en effet, cette distorsion n'a pas lieu quand on croise les mêmes mutants avec l'Hfr Cavalli qui injecte les marqueurs génétiques dans le même ordre que l'HfrP4x, mais dont le point d'origine est rejeté sur le chromosome au-delà de la région lac. L'interprétation la plus vraisemblable du phénomène est alors que l'intégration des marqueurs pro A ou B est malaisée spécifiquement dans un croisement avec l'HfrP4x6 parce que ces marqueurs sont très proches de l'origine de l'Hfr : la distance qui sépare un marqueur pro A ou B de la tête de l'Hfr étant très faible, le crossing-over qui doit nécessairement se produire dans cette région pour aboutir à l'intégration de la région pro n'a lieu de façon efficace que dans un petit nombre de cas. Mais puisque le phénomène est présenté aussi bien par les mutants pro A que par les mutants pro B, on est amené à penser que les mutations pro A comme les mutations pro B sont très proches de l'origine de l'HfrP4x6, donc, en principe, très proches entre elles. C'est ce que confirme l'expérience suivante qui montre que, selon toute vraisemblance, les mutations pro A et pro B sont cotransductibles entre elles.

2/ L'expérience est conduite de la façon que voici : une souche porteuse d'une mutation pro A, et auxotrophe pour un autre acide aminé (le tryptophane par exemple) est transduite d'une part, à l'aide d'un phage P_1 provenant d'une souche pro^+ trp^+, et d'autre part, à l'aide d'un phage P_1 provenant d'une souche pro A^+ pro B^- trp^+. Dans les deux cas, on sélectionne les transduits pro^+ et trp^+ et on examine le rapport de la fréquence des transduits pro^+ à la fréquence des transduits trp^+. Il est clair qu'au cas où les mutations pro A et pro B seraient cotransductibles, on s'attend à observer une diminution du rapport $\frac{pro^+}{trp+}$

(1) La même observation a été répétée avec les souches G7, G8, G9 (pro A) et

Fig. 7 - Croisement de la souche HfrP4x6 avec la souche G6 (pro A). La fréquence des recombinants thr^+ leu^+ str^r (- O -) et pro^+ str^r (●) est déterminée à temps variable par la technique du croisement interrompu (voir Matériels et Méthodes).

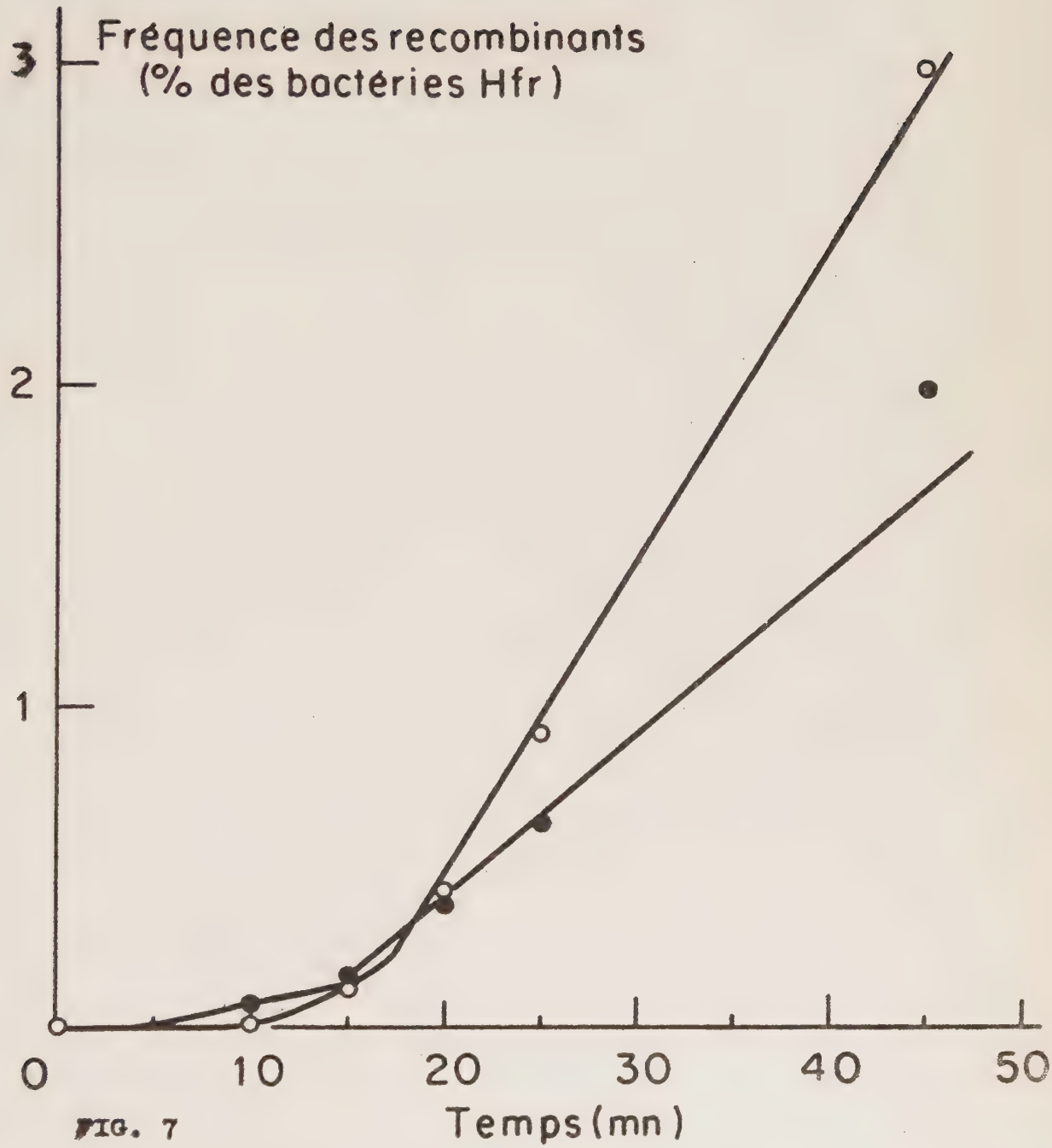

Fréquence des recombinants
(% des bactéries Hfr)
3
2
1
0
10
20
30
40
50
Temps (mn)

FIG. 7

Fig. 8 - Croisement interrompu à temps variables (voir Matériels et Méthodes) entre la souche HfrP4x6 et la souche G11 (proB).

- O - : fréquence des recombinants thr^+ leu^+ str^r.

- ● - : fréquence des recombinants pro^+ str^r.

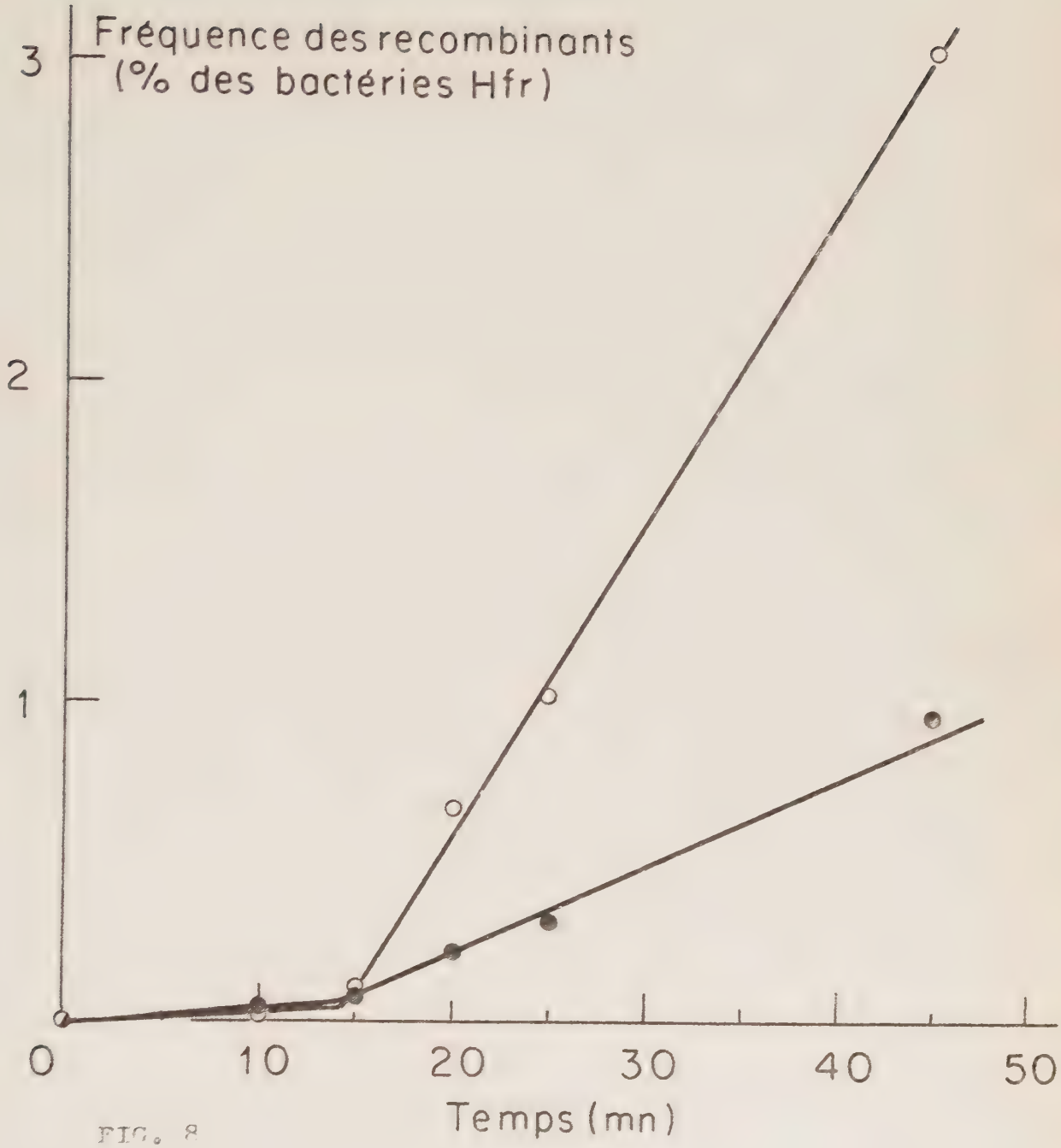

Fréquence des recombinants
(% des bactéries Hfr)
3
2
1
0
10
20
30
40
50
Temps (mn)

FIG. 8

lorsqu'on passe de la transduction faite à l'aide d'un phage provenant d'une souche sauvage à celle faite avec un phage issu d'une souche pro B^-. Les tableaux 9, 10 et 11 présentent les résultats de plusieurs expériences faites selon ce schéma. Les transductions ont été faites dans les deux sens, c'est-à-dire :

$$P_1 \text{ (pro } A^- \text{ pro } B^+) \longrightarrow \text{pro } A^+ \text{ pro } B^- \text{ (1)}$$

aussi bien que

$$P_1 \text{ (pro } A^+ \text{ pro } B^-) \longrightarrow \text{pro } A^- \text{ pro } B^+.$$

En outre, le marqueur de référence était variable selon les cas : trp, ad (purE) ou leu. Mais presque toujours on observe une variation du rapport $\frac{\text{pro}^+}{\text{trp}^+}$ (ou ad^+ ou leu^+) dans le sens attendu si pro A et pro B sont cotransductibles. Cette variation est particulièrement nette dans le cas où l'on transduit la souche χ 462 (pro A^-) par phage provenant de la souche G35 (pro A^+ pro B^+) d'une part, et par un phage issu de χ 278 d'autre part. La fréquence relative des transduits pro^+ par rapport aux transduits trp^+ diminue dans ce cas d'environ 1000 fois. Une chute d'une telle ampleur n'est pas observée, à beaucoup près, dans les autres transductions portées sur le tableau. Ceci ne surprendra pas trop si l'on pense que, telles qu'elles sont menées, ces transductions sont l'équivalent de "tests à deux points". Or on a fréquemment l'occasion d'observer d'énormes écarts dans les fréquences de cotransduction entre deux locus lorsqu'on passe d'un couple de mutations à un autre, et ces fréquences ne peuvent pas servir à évaluer les distances entre les mutations ainsi croisées deux à deux. Il se peut qu'on se trouve ici en présence d'un phénomène analogue. En tout état de cause, un seul résultat semble pouvoir être dégagé de l'expérience, savoir que, pour le moins, certaines mutations pro A sont cotransductibles avec certaines mutations pro B.

L'absence de marqueur génétique suffisamment proche dans cette région du chromosome rendait évidemment impossible la réalisation d'un test à trois points. Mais nous verrons, dans le chapitre V, une confirmation du résultat auquel nous aboutissons ici, que les mutations pro A et pro B sont très proches.

(1) A la suite du phage, entre parenthèses, est indiqué le génotype de la souche donatrice ; au bout de la flèche est le génotype de la souche réceptrice.

Tableaux 9, 10 et 11 - Cotransductibilités de mutations pro A et pro B.

La technique utilisée pour les transductions diffère un peu de celle exposée dans la section "Matériels et Méthodes". Le phage transducteur utilisé est une souche non virulente du phage P_1 (P_1kc) - A 3,5 ml d'une culture de la souche réceptrice, en phase exponentielle, (effectuée en milieu riche), on ajoute du chlorure de calcium stérile (concentration finale 2.10^{-3}M) et 0,4 ml d'une suspension de phages contenant 5.10^{8} à 10^{9} particules par ml. Le mélange est agité 2 h. à la température du laboratoire puis centrifugé 10 mn à 5000 g. Le culot bactérien est lavé en milieu 63, remis en suspension dans le même milieu et étalé, à des dilutions convenables sur milieux sélectifs appropriés. (Pour le génotype des souches utilisées voir Matériels et Méthodes). Les nombres consignés dans les tableaux représentent les fréquences de transduits obtenus.

SOUCHE DONATRICE →	G 35 (pro^+)			X 278 (pro B)			X 680 (pro A)			
SOUCHE RECEPTRICE	pro^+	trp^+	$\frac{pro^+}{trp^+} = r_1$	pro^+	trp^+	$\frac{pro^+}{trp^+} = r_2$	pro^+	trp^+	$\frac{pro^+}{trp^+} = r_2$	$\frac{r2}{r1}$
X 462 (pro A)	$0,8.10^{-5}$	1.10^{-5}	0,8	$2,4.10^{-7}$	$1,4.10^{-4}$	$1,7.10^{-3}$				$2,1.10^{-3}$
X 474 (pro B)	$0,65.10^{-7}$	$0,74.10^{-5}$	$0,87.10^{-2}$				$<0,3.10^{-9}$	2.10^{-6}	$< 1,5.10^{-4}$	$< 1,7.10^{-2}$

- Tableau 9 -

SOUCHE DONATRICE →	2001 (pro^+)			G 12 (pro B)			G 8 (pro A)			
SOUCHE RECEPTRICE	pro^+	ad^+	$\frac{pro^+}{ad^+}=r_1$	pro^+	ad^+	$\frac{pro^+}{ad^+}=r_2$	pro^+	ad^+	$\frac{pro^+}{ad^+}=r_2$	$\frac{r2}{r1}$
G 105 (pro A)	$0,75.10^{-7}$	5.10^{-7}	0,15	3.10^{-8}	5.10^{-7}	0,06				0,4
G 101 (pro B)	$1,6.10^{-6}$	$6,4.10^{-6}$	0,25				$2,5.10^{-7}$	$2,5.10^{-6}$	0,1	0,4

– Tableau 10 –

SOUCHE DONATRICE →	G 21 (pro^+)			G 101 (pro B)			G 105 (pro A)			
SOUCHE RECEPTRICE	pro^+	leu^+	$\frac{pro^+}{leu^+}=r_1$	pro^+	leu^+	$\frac{pro^+}{leu^+}=r_2$	pro^+	leu^+	$\frac{pro^+}{leu^+}=r_2$	$\frac{r2}{r1}$
G 8 (pro A)	$4,8.10^{-7}$	$0,7.10^{-5}$	7.10^{-2}	$1,7.10^{-7}$	$0,8.10^{-5}$	$2,1.10^{-2}$				0,3
G 12 (pro B)	2.10^{-7}	$0,55.10^{-5}$	$3,6.10^{-2}$				$2,5.10^{-7}$	$3,6.10^{-6}$	97.10^{-1}	2

– Tableau 11 –

B/ MUTANTS DE LA VOIE DE DEGRADATION DE LA PROLINE.

L'isolement de mutants d'E.coli K 12 incapables d'oxyder la proline est important pour démontrer l'indépendance des voies de biosynthèse et de dégradation de cet acide aminé. Frank et Ranhand ont montré (18) qu'une mutation affectant l'activité de la PCA - réductase n'entraîne pas de modification du système d'oxydation de la proline. L'étude des mutants de la voie de dégradation permet de vérifier la proposition réciproque.

1/ Obtention des mutants de la voie de dégradation

Nous avons cherché à sélectionner de tels mutants par action de la pénicilline. Pour cela nous sommes partis d'une souche dotée d'une mutation de la classe 1, dont la croissance, par conséquent, s'effectue indifféremment sur milieu additionné de glutamate ou de proline, et nous avons recherché des variants dont l'exigence nutritionnelle n'est plus satisfaite quand on remplace le glutamate par la proline. L'intérêt de cette méthode vient de ce que la pénicilline est un agent sélectif d'autant plus efficace qu'il est appliqué dans des conditions où les bactéries qu'il s'agit d'éliminer croissent mieux. Or, dans un milieu de culture composé de tampon 63 (où la source d'azote est le sulfate d'ammonium), de glycérol à la concentration 2 g/l, et de proline à 2 g/l (les autres facteurs de croissance étant ajoutés à la concentration initiale 0,1 g/l), la souche PA 625, d'où nous sommes partis, a un temps de génération d'environ 75 mm. Dans un milieu de culture identique à ceci près que, le sulfate d'ammonium ayant été supprimé, la proline constitue la seule source d'azote, le temps de génération est d'environ 130 mn. Avec la souche PA 625, porteuse d'une mutation qui entraîne l'exigence en glutamate ou proline, on peut sélectionner, par action de la pénicilline, des mutants incapables d'oxyder la proline en glutamate dans l'un ou l'autre milieu et il est clair que le premier milieu doit permettre une sélection plus efficace. Avec une souche prototrophe, la sélection ne peut se faire que dans le deuxième milieu, donc dans des conditions assez difficiles et ceci explique peut-être que de tels mutants aient été recherchés et non trouvés (18) par d'autres auteurs. Nous n'avons pas cherché à comparer l'efficacité des deux méthodes, mais, utilisant la première, nous avons constaté qu'elle permet en effet d'isoler les mutants cherchés.

Les mutants obtenus à partir de la souche PA 625 l'ont été après mutagenèse de cette souche à la nitrosoguanidine. Les sélections à la pénicilline ont été menées selon la méthode ordinaire (voir Matériels et Méthodes).

2/ Propriétés.

a) Croissance

Dans un premier temps, les mutants que nous isolions étaient caractérisés par le fait qu'ils croissent en présence de glutamate et non en présence de proline, ces deux acides aminés étant ajoutés à la concentration habituelle pour les facteurs de croissance : 0,1 g/l. Nous avons vérifié que ces mutants, à la différence de la souche PA 625 dont ils dérivent, sont aussi incapables de croître sur un milieu où la proline est ajoutée comme seule source de carbone, à la concentration 6 g/l (Sur un tel milieu, la souche parentale forme des colonies à 37° C en 72 heures).

Par ailleurs, ces mutants n'exigent nullement, pour croître, la présence de proline dans le milieu. Ils ne sont pas auxotrophes pour cet acide aminé, ce qui montre que la biosynthèse doit en être effectuée chez le mutant comme chez le parent. En fait, une étape mutationnelle supplémentaire est nécessaire pour obtenir, à partir d'une souche incapable d'oxyder la proline, des mutants qui soient aussi auxotrophes pour cet acide aminé. De tels doubles mutants ont été isolés à partir de la souche G 21.

Ceci confirme donc l'indépendance des deux systèmes enzymatiques d'utilisation et de synthèse de la proline.

b) Enzymologie

Utilisant un test qualitatif (voir Matériels et Méthodes), on constate que certains de ces mutants sont dépourvus de proline-oxydase, même lorsqu'ils ont été cultivés dans un milieu où la proline est présente à la concentration initiale 2 g/l (tableau 12). D'autres ont une proline-oxydase active. C'est le cas de la souche G 20 pour laquelle en revanche, le dosage de la PCA-oxydase montre que cette activité est absente (fig.9).

ACTIVITE spécifique de la proline-oxydase	PA 625	G 19	G 20
1er dosage	2,7	< 0,1	1,2
2e dosage	2,08	< 0,1	1,08

Tableau 12 - Activité spécifique de la proline-oxydase chez deux mutants, G 19 et G 20, incapables d'utiliser la proline comme source de carbone ou d'azote, et chez la souche parentale (PA 625).

Les bactéries étaient cultivées en présence de succinate (4g/l) et de proline (2g/l).

Fig. 9 - Identification du mutant G 20 comme dépourvu de PCA oxydase active.

▲ : Réduction du NADP par un extrait brut de la souche PA 625, en présence de PCA.

Δ : Réduction du NADP par un extrait brut de la souche PA 625 en l'absence de PCA.

O : Réduction du NADP par un extrait brut de la souche G 20, en présence de PCA.

Les extraits étaient faits à partir de bactéries cultivées en présence de succinate (4 g/l) de glutamate (1 g/l) et de proline (1 g/l).

La concentration en protéines des extraits était :

- 50 mg/ml pour l'extrait de PA 625, et
- 46 mg/ml pour l'extrait de G.20.

Pour les autres conditions, voir Matériels et Méthodes.

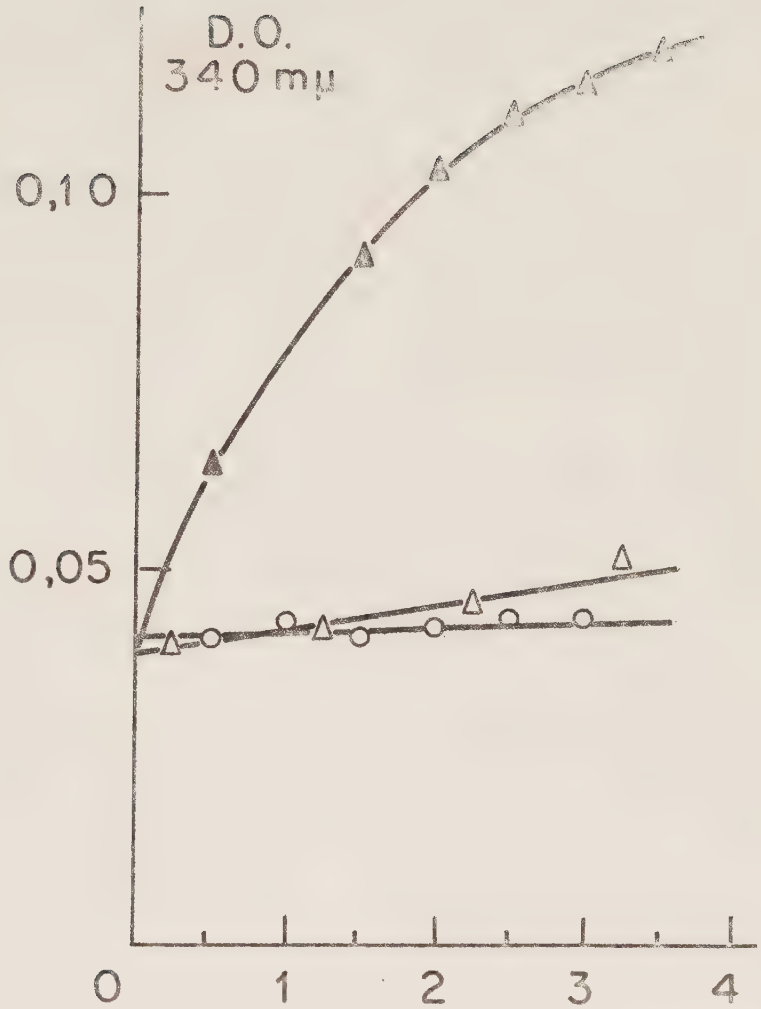


FIG. 9

Certains mutants que nous avons examinés semblent dotés d'une mutation dont les effets sont pléiotropes. Dans la souche G 20, dépourvue de PCA oxydase, la proline-oxydase paraît n'être présente qu'à 50 % du taux auquel on la trouve dans la souche parentale (PA 625). Dans la souche G 19, dépourvue de proline-oxydase, la PCA oxydase semble aussi être présente avec une activité diminuée, mais ici, on ne dispose pas d'un test vraiment quantitatif.

c) Localisation génétique

3 mutants ont été plus particulièrement examinés : G 19, G 21, et G 47. La souche G 21 est porteuse de la mutation PCA-oxydase$^-$ de G 20. G 47 est un mutant dépourvu de proline-oxydase active. Toutes ces souches sont porteuses d'une même mutation ad$^-$ située dans le locus purE, d'une mutation glt$^-$ au locus gltA, et d'une mutation his$^-$. Un croisement interrompu à temps variables entre chacune de ces trois souches d'une part, l'HfrH d'autre part, donne alors l'ordre suivant : purE, glt R, poaA [1], his. L'examen des fig. (10) et (11) montre que l'entrée du locus poaA a lieu environ 8 mn après celle du locus gltA. Ceci permet de situer ce locus dans le proche voisinage des locus pyr C, pur B.

Par croisement entre la souche G 19 et un dérivé de l'Hfr H porteur d'une mutation pyr C (souche CA 235 du Dr Beckwith) une souche porteuse à la fois d'une mutation pyr C et de la mutation poaA de la souche G 19 a été construite.

Un croisement interrompu à temps variable entre cette souche et l'Hfr H montre qu'en effet les marqueurs pyr C et poa A sont très proches l'un de l'autre et leurs temps d'entrée difficiles à distinguer. Le nombre de recombinants poa$^+$ str^r systématiquement moins élevé que celui des recombinants pyr$^+$ str^r (fig.11) suggère que le marqueur poaA entre dans ce croisement un peu après le marqueur pyr C. On aurait donc l'ordre : pur E, glt A, pyr C, poa A, his, mais ceci ne peut être affirmé. En tout cas les marqueurs pyr C et poa A paraissent suffisamment proches pour être cotransductibles et c'est ce qui a été vérifié.

(1) Nous proposons le symbole poaA pour le locus où se trouvent les mutations qui entrainent l'inactivation de la proline-oxydase ou de la PCA-oxydase. Il peut s'agir de deux cistrons distincts, gènes de structure respectifs de ces deux enzymes, mais cela n'est pas prouvé.

La souche pyr C poa A a été transduite par un phage P_1 provenant d'une souche sauvage et l'on a sélectionné les transduits pyr^+, les transduits poa^+, capables d'utiliser la proline comme source de carbone, et les éventuels doubles transduits pyr^+ poa^+. Le tableau (13) montre qu'on trouve effectivement de tels doubles transduits et qu'ils sont même assez fréquents :la fréquence observée de cotransduction, exprimée en % des transduits poa^+, est d'environ 68 %.

Fig. 10 - Localisation de la mutation qui entraîne l'inaptitude à croître sur proline comme source de carbone chez la souche G 20. La souche G 20 est dépourvue de PCA oxydase active (cf fig.9). Croisement interrompu à temps variables entre l'Hfr H et la souche G. 20 (cf Matériels et Méthodes).

● : Recombinants glt^+ str^r

O : Recombinants poa^+ str^r (ces derniers sont sélectionnés par leur aptitude à croître sur un milieu gélosé où la seule source de carbone est la proline à la concentration 6 g/l.)

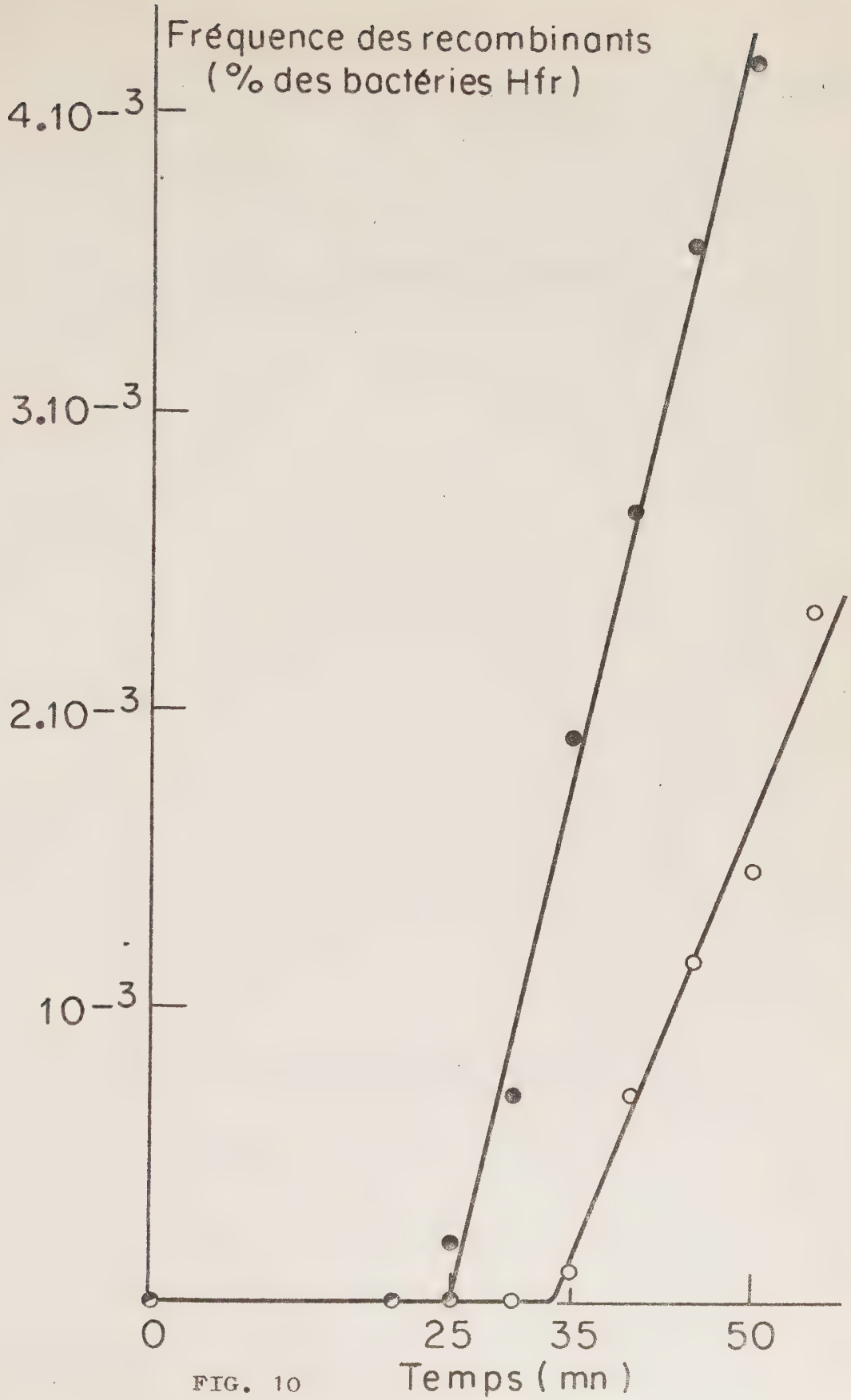

Fréquence des recombinants
(% des bactéries Hfr)
4.10−3
3.10−3
2.10−3
10−3
0
25
35
50
Temps (mn)

FIG. 10

Fig. 11 - Croisement, interrompu à temps variables, entre la souche HfrH et une souche F^- poaA pyr C porteuse de la mutation poaA de la souche G 19.

Pour les conditions, voir Matériels et Méthodes.

O : Recombinants glt^+ str^r

□ : Recombinants pyr^+ str^r

▲ : Recombinants poa^+ str^r.

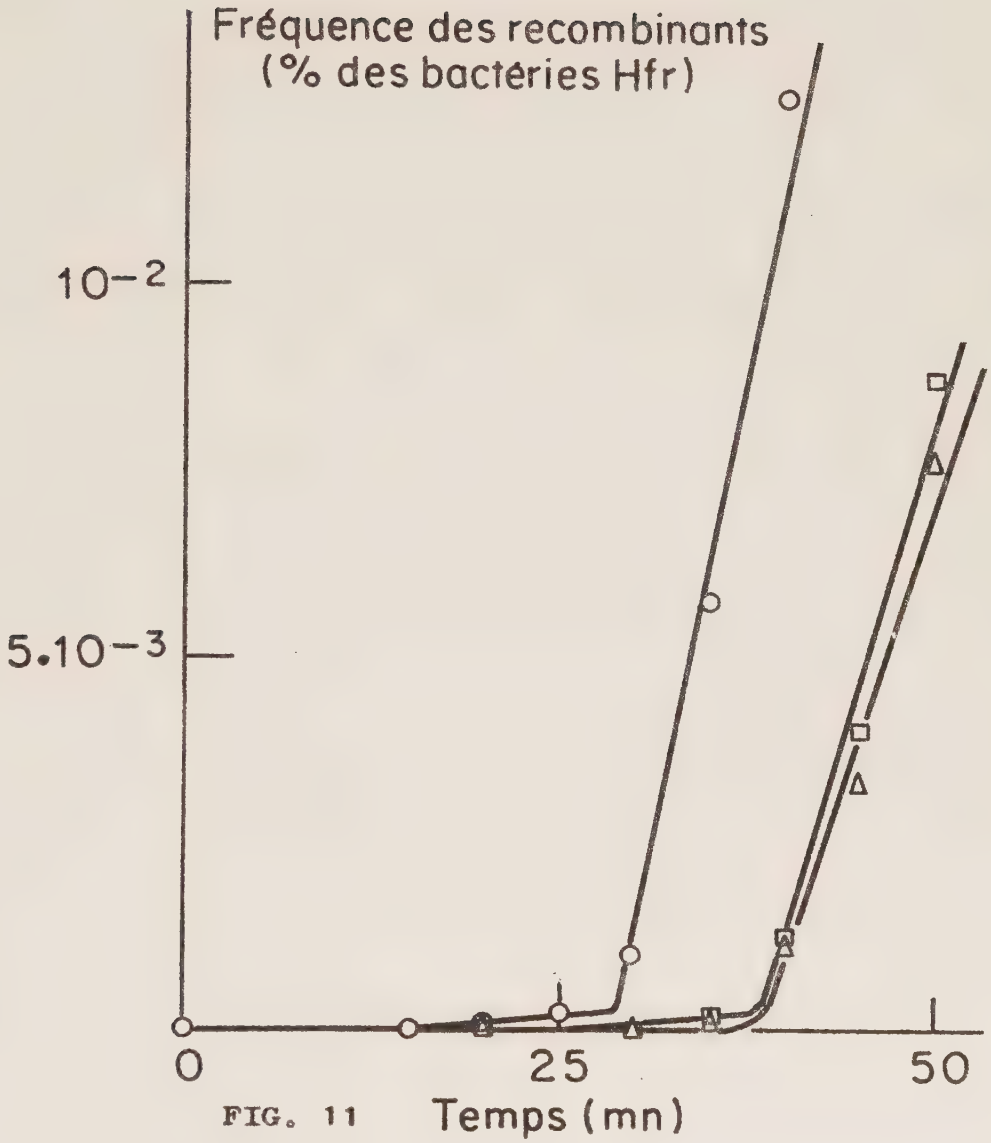

Fréquence des recombinants
(% des bactéries Hfr)
10−2
5.10−3
0
25
50
Temps (mn)

FIG. 11

TRANSDUCTION	pyr^+	poa^+	$pyr^+ \ poa^+$	$\frac{pyr^+ \ poa^+}{poa^+}$	$\frac{pyr^+ \ poa^+}{pyr^+}$
1	195	38	25	0,65	0,12
2	135	28	20	0,71	0,14

Tableau 13 - Cotransductibilité des marqueurs pyr C et poa A.
Pour la souche utilisée voir le texte.
Pour les conditions utilisées pour la transduction, voir légende du tableau 9.

CHAPITRE IV

REGULATION AU NIVEAU GENETIQUE

La plupart des systèmes qui chez les bactéries assurent la production d'un acide aminé sont réglés à deux niveaux :

- l'activité des gènes est modulée par des phénomènes d'induction ou de répression ;
- celle de certains enzymes est tributaire d'une rétroinhibition exercée par le métabolite terminal de la chaîne de biosynthèse.

Dans ce chapitre, c'est du niveau génétique de la régulation qu'il sera question. Pour la voie de biosynthèse de la proline, la situation n'est pas sans rappeler, tout au moins à première vue, ce qu'on sait de la biosynthèse de l'arginine et de son déterminisme génétique : dans les deux cas en effet, on a affaire à un ensemble de gènes disséminés sur le chromosome bactérien. Dans le cas de l'arginine, cette dispersion des gènes de structure des différents enzymes de biosynthèse n'empêche pas que tous voient leur activité règlée par l'intermédiaire du produit d'un même gène régulateur, lequel produit, lorsque l'arginine est présente, agit comme répresseur au niveau de gènes opérateurs identifiés par les classiques mutations o^c auxquels ils donnent lieu (27). Il ne semble pas en être de même pour la biosynthèse de la proline. Selon Baich et Pierson (28) aucune régulation de la synthèse de la PCA réductase n'a lieu chez E.coli K 12. Ces auteurs fondent leur conclusion sur le fait que la proline ne réprime pas la synthèse de l'enzyme et que, d'autre part, la production, par une suspension de bactéries, de proline, à partir de γ-semialdéhyde glutamique paraît dans une certaine mesure proportionnelle à la concentration du semialdéhyde dans la suspension. Ce dernier point donne en effet à penser que la PCA réductase est toujours présente en quantité non limitante. On pourrait, il est vrai, imaginer que le PCA induit la synthèse de PCA réductase. Mais l'expérience de Baich et Pierson est faite avec des cellules en suspension, dans des conditions où, en principe, aucune croissance n'a lieu. Nous reviendrons d'ailleurs sur ce point. Il reste que, si une régulation génétique a lieu dans la voie de biosynthèse, elle semble devoir s'exercer au niveau de la synthèse des enzymes qui transforment le glutamate en PCA, plutôt qu'au niveau de la synthèse de PCA réductase.

Nous avons tenté de reprendre cette question en examinant l'effet, sur l'activité de la PCA synthétase et de la PCA réductase, de la croissance dans un milieu où la proline est ajoutée en quantités limitantes. On peut, par une telle méthode, espérer mettre en évidence une dérepression de la synthèse des enzymes anaboliques plus aisément qu'on ne peut démontrer une répression de cette même synthèse sous l'effet de grandes concentrations de proline. C'est à l'exposé de ces expériences que sera consacrée la première partie de ce chapitre.

Pour la voie de dégradation, dont les caractéristiques nous retiendront dans la deuxième partie de ce chapitre, Frank et Rybicki (29) ont montré que chez E.coli B la synthèse des enzymes qui oxydent la proline est inductible. Nous avons retrouvé ce résultat pour E.coli K 12 et nous avons isolé des mutants qui synthétisent constitutivement la proline-oxydase. Nous en décrirons quelques propriétés.

A - SUR LA REGULATION DE LA SYNTHESE DES ENZYMES ANABOLIQUES.

a/ PCA synthétase

Utilisant le dosage de l'accumulation de PCA in vivo par des cellules incubées en présence de glutamate, ainsi qu'il a été expliqué dans la section Matériels et Méthodes, nous avons tenté de modifier, de diverses manières, la valeur de l'activité "PCA synthétase" telle qu'elle peut être déterminée à partir du taux d'accumulation de PCA.

Les diverses conditions que nous avons examinées sont les suivantes :

- culture dans un milieu où la proline est présente en quantité limitante, afin de déceler une éventuelle dérepression,
- culture en présence de PCA, afin de déceler une éventuelle répression,
- culture en présence de glutamate, afin de déceler une éventuelle induction.

Notons qu'il n'était pas possible de déceler une répression due éventuellement à la proline en comparant la valeur de l'activité PCA synthétase pour deux cultures faites respectivement en présence et en absence de proline. L'accumulation de PCA ne peut en effet se mesurer que chez un mutant dépourvu de PCA réductase, dont la croissance, par conséquent, exige la présence de proline dans le milieu. Une autre condition expérimentale impossible à réaliser est la suivante : culture dans un milieu où c'est le PCA, non la proline, qui est présent en quantité limitante. Ceci exigerait que la souche utilisée fût incapable de synthétiser le PCA et ceci à son tour entraînerait l'impossibilité de mesurer le taux d'accumulation du PCA.

On peut donner des résultats, rassemblés dans le tableau 14, l'interprétation suivante :

1/ Il ne semble pas que la présence de proline en quantité limitante aboutisse à déréprimer l'activité PCA synthétase. L'activité observée dans ces conditions, tant avec la souche G 22 qu'avec G 53, est très semblable à l'activité trouvée lorsque les souches sont cultivées dans un milieu où la proline est initialement ajoutée à la concentration 10^{-3}M.

Ces deux souches synthétisent la proline-oxydase lorsqu'elles y sont induites. A supposer qu'une telle synthèse ait lieu dans les conditions de l'expérience, ceci ne pouvait jouer qu'en faveur de l'expérimentateur, en tendant à abaisser la concentration interne de proline, donc à accentuer une dérépression éventuelle.

A la différence de G 22, G 53 ne synthétise pas de PCA-oxydase active. On pouvait en effet imaginer que dans une souche capable, comme G 22, de synthétiser la PCA oxydase, la dérépression de la synthèse de PCA synthétase fût masquée par un mécanisme du type suivant : sous l'effet de l'abaissement de la concentration en proline, la synthèse de PCA synthétase est déréprimée ; la concentration en PCA, dont la production a lieu de façon accrue, est suffisante pour induire la synthèse de PCA oxydase à un taux élevé.

SOUCHE	PROLINE 10^{-3} M	PROLINE LIMITANTE	+ PCA	+ GLUTAMATE
G 22	24	23	–	–
G 53	51	49	–	–
G 284	53	–	38	47

Tableau 14 - Activité spécifique de la PCA-synthétase en fonction des conditions de culture.

Pour les conditions de culture en présence de PCA et de glutamate, voir le texte.

Les cultures en présence de quantités limitantes de proline sont effectuées en chemostat (30). Le temps de doublement était fixé approximativement à 6,9 heures. La culture était collectée dans un erlenmeyer maintenu à 0° C. Les dosages étaient faits avec une culture qu'on avait laissé se développer pendant 18 heures, à partir du moment où le régime stationnaire était atteint. La fréquence des réverses prototrophes présents dans la culture était déterminée et n'excédait pas 10^{-5}.

Pour les modalités de dosage de la PCA synthétase, voir Matériels et Méthodes.

Le taux d'accumulation du PCA par lequel on mesure ensuite l'activité PCA synthétase, donnerait alors une valeur de cette activité très inférieure à la valeur réelle, du fait qu'une large fraction de PCA serait oxydée au fur et à mesure de sa production. Les résultats très semblables trouvés avec les souches G 22 et G 53 montrent qu'en fait il ne doit pas en être ainsi.

2/ La présence, dans le milieu de culture, de glutamate ou de PCA ne paraît pas influer davantage sur la valeur de l'activité de la PCA-synthétase. Compte tenu des faibles quantités de PCA dont nous disposions, c'est avec des cultures pleinement développées en présence de la seule proline, puis autorisées, après dilution, à effectuer deux doublements seulement dans un milieu contenant le PCA à une concentration voisine de 2.10^{-3}M que nous faisions nos mesures. Ces deux doublements avaient lieu en présence de proline, indispensable pour assurer la croissance d'une souche porteuse d'une mutation proC. On attend, si le PCA exerce dans ces conditions une répression totale de la synthèse de PCA synthétase, que le taux spécifique d'accumulation du PCA tombe à peu près au quart de la valeur trouvée dans une culture témoin, qui après dilution, effectue deux doublements supplémentaires dans un milieu doté de proline, mais non de PCA. Il est bien clair qu'une telle chute de l'activité spécifique de la PCA synthétase n'est pas observée.

En revanche, les conditions de l'expérience sont sans doute trop peu raffinées pour permettre d'affirmer qu'une répression partielle, sous l'action du PCA, n'a pas lieu. En fait, l'existence d'une telle répression partielle est suggérée par les données expérimentales.

Les mêmes conclusions peuvent être avancées pour ce qui concerne l'effet du glutamate. En définitive, il ne nous a donc pas été possible de mettre en évidence une modulation du taux de synthèse de la PCA synthétase sous l'effet du glutamate, du PCA, ou de la proline. On ne saurait tenir pour absolument démontrée l'absence d'une telle régulation, compte tenu, en particulier, du fait que le seul moyen dont on dispose pour évaluer la PCA synthétase est très indirect. Nous retiendrons donc simplement, pour l'instant, que l'absence de régulation de la synthèse de la PCA synthétase apparaît tout à fait possible, quitte à voir par la suite si l'étude de certains mutants de régulation (voir chap.V et VI) confirme ou non cette possibilité.

b/ PCA - réductase

Là encore, nous avons tenté de déréprimer la synthèse de PCA réductase en cultivant une souche porteuse d'une mutation proA (PA 417) dans un milieu où la proline était l'aliment limitant. L'expérience donne le même résultat négatif que pour la PCA synthétase (tableau 15). Il ne paraît donc pas que la synthèse de PCA réductase puisse être réprimée directement par la proline. Pour la PCA réductase, on dispose d'un dosage in vitro précis et, de ce point de vue, le résultat de l'expérience paraît dépourvu d'ambigüité.

Nous avons signalé une possibilité selon laquelle la synthèse de PCA réductase serait induite par le PCA. Cette hypothèse est rendue à vrai dire très peu vraisemblable par le fait que les mutants proA et proB, qui ne synthétisent pas de PCA, sont cependant pourvus de PCA réductase active à un taux normal. Nous avons tout de même examiné l'effet de l'addition de PCA dans le milieu de culture de la souche PA 417, et cela dans les mêmes conditions que nous avons décrites à propos d'un effet éventuel du PCA sur la synthèse de PCA synthétase. Il ne nous a pas été davantage possible de déceler une variation de l'activité spécifique de la PCA réductase en fonction de la présence de PCA dans le milieu de culture.

La conclusion à laquelle on se trouve amené est donc que, ni au niveau de la PCA synthétase, ni à celui de la PCA réductase, une régulation de la synthèse des enzymes anaboliques ne semble avoir lieu dans notre système. Deux raisons nous paraissent interdire de poser une conclusion plus ferme. C'est d'une part, l'incertitude qui s'attache à la détermination du niveau de PCA synthétase. D'autre part, on peut toujours se demander si une interférence entre les régulations des voies anaboliques et cataboliques ne masque pas les phénomènes de répression ou de dérépression que nous cherchions à mettre en évidence. Cette question est surtout à considérer pour interpréter les expériences concernant la PCA synthétase. Nous avons vu que, dans un cas au moins, la mise hors circuit, grâce à une mutation PCA oxydase$^-$, de la voie catabolique, ne modifie pas les résultats.

PROLINE 10^{-3} M	PROLINE LIMITANTE	+ PCA
3,75	3,6	3,9

Tableau 15 - Activité spécifique de la PCA réductase dans un extrait brut de la souche PA 417 cultivée dans diverses conditions.

La culture en présence de proline limitante, effectuée en chémostat, avait un temps de doublement de 7 heures.

Pour déceler un effet éventuel du PCA, une culture développée en présence de glycérol 4 g/l et de proline 10^{-3} M pendant la nuit, était diluée deux fois dans un milieu neuf où la proline était remplacée par le PCA, approximativement à la concentration 10^{-3} M. Les bactéries étaient récoltées après que la culture eût effectué au moins un doublement.

B - REGULATION DE LA SYNTHESE DES ENZYMES CATABOLIQUES.

Le caractère inductible de la synthèse des enzymes cataboliques sera ici rappelé. L'isolement de mutants chez lesquels cette synthèse est devenue constitutive sera ensuite décrit, ainsi que la localisation de la mutation correspondante.

a/ Inductibilité de la synthèse des enzymes cataboliques

Franck et Rybicki (29) ont, les premiers, montré que le système d'oxydation de la proline n'est pas présent, ou du moins ne l'est qu'avec une activité très diminuée, dans une culture d'E.coli effectuée en l'absence de proline. Ces auteurs ont pu suivre l'apparition de l'activité proline-oxydasique après addition de proline au milieu de culture, et tracer ainsi une courbe d'induction. Ces expériences portaient sur la souche B d'E.coli. D'autre part, l'aptitude à oxyder la proline était déterminée directement à l'aide de la quantité d'oxygène consommée par des bactéries incubées avec ou sans proline. C'est donc le système d'oxydation de la proline considéré globalement dont le caractère inductible était établi, et non chacun des enzymes (proline - oxydase - et PCA-oxydase) considéré séparément. En fait, les résultats de Franck et Rybicki ne seraient pas contradictoires avec l'existence d'une synthèse constitutive de PCA-oxydase et d'une synthèse inductible de proline-oxydase.

Nous avons retrouvé ce caractère inductible chez E.coli K 12, et pour les deux enzymes cataboliques pris séparément.

1- Proline-oxydase

Le tableau (16) indique les valeurs trouvées pour l'activité spécifique de la proline-oxydase chez quelques souches poa^+ cultivées en présence de quantités variables de proline. Dans un extrait brut provenant d'une culture effectuée en l'absence de proline, on ne décèle pas d'activité proline-oxydasique. Dans une culture où la proline a été ajoutée à la concentration initiale 2 g/l, l'activité spécifique de la proline-oxydase est augmentée au moins 25 fois. Ceci met donc en évidence le rôle inducteur de la proline (ou d'un métabolite qui en dérive) dans la synthèse de proline-oxydase.

SOUCHE	CONCENTRATION INITIALE DE LA CULTURE EN PROLINE		
	0	10^{-3} M	2.10^{-2} M
Hfr H	< 0,04	0,19	1,2
Hfr OR 21	< 0,04	0,06	0,86
C 600	< 0,04	0,26	0,83

Tableau 16 - Activité spécifique de la proline-oxydase dans un extrait brut de diverses souches, cultivées en présence de concentrations croissantes de proline (les valeurs indiquées pour les concentrations sont celles qui prévalent au début de la culture).

Fig. 12 - Oxydation du NADP par un extrait brut de la souche PA 625, en l'absence (-O- et -●-) et en présence de PCA (-Δ- et -▲-).

a/ Oxydation par un extrait provenant d'une culture où la proline avait été ajoutée, initialement, à la concentration 1 g/l.

b/ Oxydation par un extrait provenant d'une culture effectuée en l'absence de proline.

Dans les deux cas, la source de carbone était le glycérol, ajouté à la concentration initiale 4 g/l.

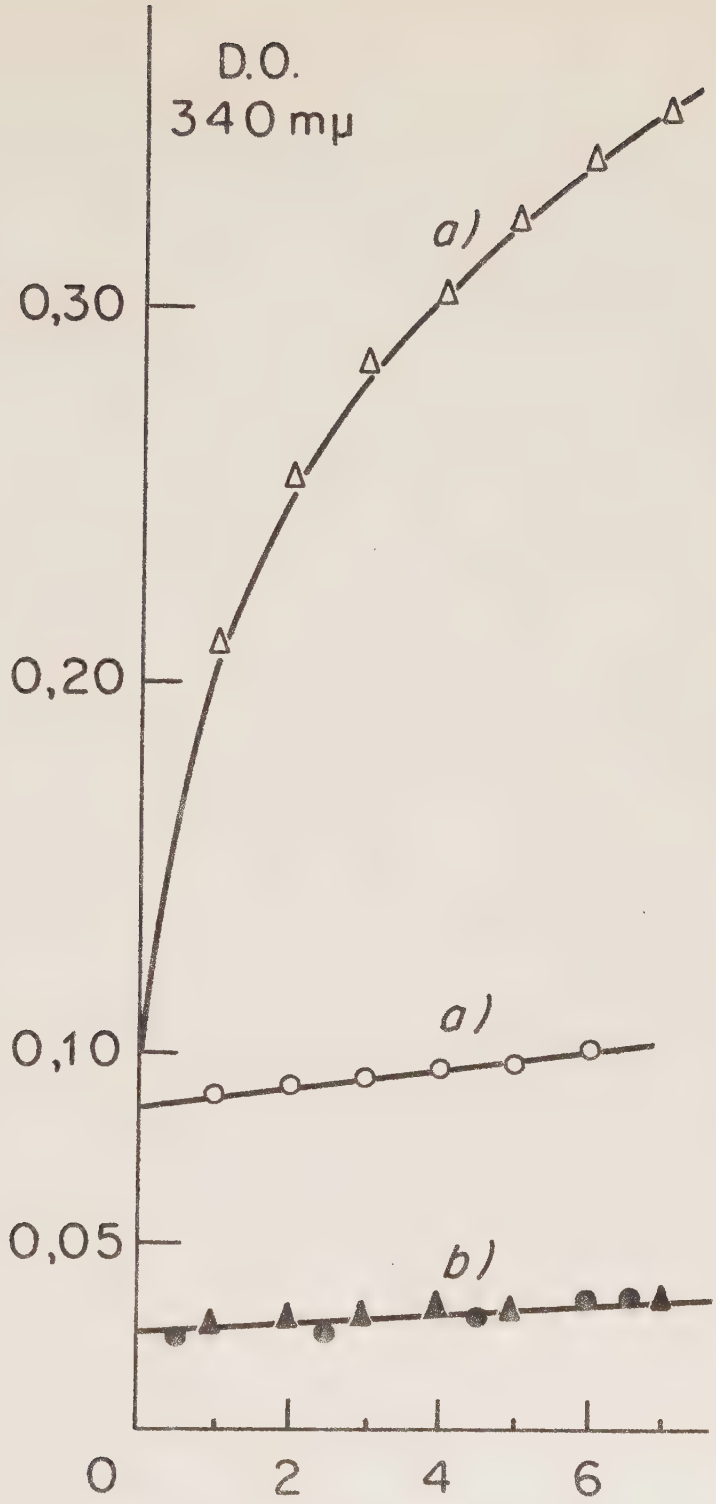


FIG. 12

2 - PCA-oxydase

La figure (12) permet de comparer l'activité PCA-oxydasique de deux extraits bruts provenant respectivement de deux cultures faites en présence et en l'absence de proline. Avec l'extrait de la culture non induite, on n'observe pratiquement aucune réduction du NADP en présence de PCA, ce qui, là encore, rend apparent le caractère inductible de la synthèse de PCA-oxydase. Une étude quantitative de l'induction n'a pu être pratiquée du fait qu'aucun inducteur gratuit n'est connu dans ce système. Du reste, si la proline est bien l'inducteur, un inducteur gratuit serait selon toute vraisemblance un proche analogue de la proline et aurait toutes chances d'être en même temps un inhibiteur de croissance. De tels inhibiteurs sont connus (cf chapitre V) mais ne sont pas utilisables, du fait même qu'ils sont inhibiteurs, pour une étude de l'induction.

Les valeurs trouvées pour l'activité spécifique de la proline-oxydase ont donc une signification imprécise puisque, dans la culture faite en présence de proline, l'inducteur est dégradé au fur et à mesure de l'induction.

b/ Isolement de mutants constitutifs pour la synthèse de proline-oxydase

Pour isoler des mutants où la synthèse de la proline-oxydase était devenue constitutive, nous avons tiré parti du fait qu'à basse température, l'induction de la synthèse de divers enzymes n'a pas lieu, ou du moins ne se produit qu'avec une efficacité très faible. Ceci a été montré par Ingraham et Marc (31) dans le cas de la β -galactosidase et de la tryptophanase. Ces auteurs ont en outre constaté que trois acides aminés, l'alanine, la proline, et le tryptophane, sont utilisés par E.coli comme source de carbone à température "normale" (25° C et au-delà) mais non à basse température (15° C). Toutefois, des variants apparaissent, capables de croître à basse température en utilisant ces acides aminés comme source de carbone. On pouvait donc supposer que ces variants sont des mutants chez lesquels la synthèse des enzymes nécessaires pour l'utilisation de l'acide aminé a lieu de façon constitutive. De fait, Gartner et Riley (32) ont montré qu'il y a là une méthode pour obtenir des mutants constitutifs pour la synthèse de la tryptophanase. Nous avons recherché s'il en va de même pour ce qui concerne le système d'utilisation de la proline.

Pour cela, des bactéries soumises à l'action d'un agent mutagène et chez lesquelles la ségrégation de mutations récessives avait été permise par plusieurs cycles de génération en milieu riche, étaient étalées, à raison de 10^6 à 10^7 bactéries par boîte, sur des boîtes de milieu gélosé où le seul aliment carboné disponible était la proline, ajoutée à la concentration de 6 g/l. Les boîtes étaient incubées à 15° C. Après 8 à 12 jours d'incubation, des microcolonies, de tailles très diverses, étaient repérables sur la gélose à la loupe binoculaire. Les colonies de plus grande taille étaient reprises, purifiées par étalement en stries sur milieu complet, puis examinées pour la constitutivité de la proline-oxydase. Il est apparu que 10 % environ des colonies reprises sur une boîte donnée fournissaient en effet un test de constitutivité franchement positif.

La méthode utilisée par Gartner et Riley dans le cas de la tryptophanase s'avère donc efficace aussi pour la sélection de mutants constitutifs pour la proline-oxydase. On remarque toutefois qu'une proportion importante des microcolonies qui apparaissent à 15° C ne sont pas des mutants constitutifs. Ceci peut tenir pour une part à la difficulté qu'il y a reprendre ces microcolonies, du fait de leur petite taille. Mais on peut aussi imaginer que nombre d'entre elles sont porteuses d'une mutation qui rend la synthèse de proline-oxydase non pas constitutive à toute température, mais inductible à basse température. Une autre méthode d'obtention de mutants constitutifs est possible dans le cas du système d'oxydation de la proline. Cette méthode trouve son point de départ dans une observation effectuée par W. Epstein et J. Beckwith, que nous remercions de nous l'avoir aimablement communiquée. Les souches 3000 x 111, 3000 x 103 et 3000 y 23 sont des dérivés de la souche Hfr H, isolés indépendamment mais toutes porteuses d'une délétion lac-pro qui couvre la totalité de l'opéron lac, le cistron pro B et probablement un fragment du cistron pro A. Le cistron pro C parait en revanche intact dans ces souches (cf. les propriétés de la souche 2000 x 111, décrite au chapitre III). Ces trois mutants ont donc une PCA réductase active, mais sont incapables de synthétiser le PCA à partir du glutamate.

Or, étalées sur un milieu dépourvu de proline et de PCA, ces souches fournissent des variants redevenus prototrophes pour ce qui concerne la proline, avec une fréquence apparente d'environ 10^{-7}. Nous avons vérifié que la plupart des mutants "réverses" ainsi obtenus sont en fait constitutifs pour la proline-oxydase.

Ainsi, dans une expérience où 15 réverses indépendants de la souche 3000 x 111 étaient testés, 13 fournissaient un test de constitutivité positif. Les deux mutants réverses où l'on ne décelait aucune synthèse constitutive de proline-oxydase croissaient en fait très lentement en l'absence de proline. Ils n'ont pas été étudiés, mais il pourrait s'agir d'un phénomène de suppression analogue, sinon identique, à celui décrit par Itikawa et al. (13) (voir Introduction p. 6).

Pour expliquer que la synthèse constitutive des enzymes cataboliques pallie l'absence d'activité PCA synthétase, l'hypothèse la plus simple consiste à admettre que la réaction catalysée par la PCA-oxydase (oxydation du PCA en glutamate) fonctionne de façon réversible et que, dans des conditions où aucune autre source de PCA n'est disponible pour la cellule, la PCA-oxydase catalyse en fait la réduction du glutamate en PCA. La "suppression" à laquelle on assiste alors, d'une délétion de la région pro B, est d'ailleurs très efficace. Cultivés en présence de fortes concentrations de glutamate (2 g/l) les réverses constitutifs ont un taux de croissance à peu près identique à celui du parent sauvage.

c/ Propriétés des mutants constitutifs pour la proline-oxydase

1 - Activité spécifique de la proline-oxydase dans les souches constitutives.

Le tableau (17) indique la valeur trouvée pour l'activité spécifique de la proline-oxydase dans quelques souches constitutives. La mesure de cette activité a été effectuée dans deux conditions différentes, selon que la souche avait été cultivée dans un milieu contenant la proline à la concentration initiale 2 g/l, ou, au contraire, dans un milieu contenant initialement la proline à la concentration 0,1 g/l. Cette dernière condition a été réalisée, plutôt que celle qui aurait consisté à cultiver la souche dans un milieu totalement dépourvu de proline, du fait qu'un certain nombre de mutants constitutifs se sont révélés être auxotrophes pour la proline (ce point est discuté plus loin, cf le paragraphe 2) et exigeaient, par conséquent, la présence de proline dans le milieu de culture. Une assez grande variété est visible parmi les souches constitutives. On peut notamment distinguer une classe de mutants où la présence de proline à haute concentration, dans le milieu de culture, induit une synthèse accrue de proline-oxydase(G1, G404, G407).

SOUCHE	SOUCHE CULTIVEE EN PRESENCE DE PROLINE 10^{-3} M	SOUCHE CULTIVEE EN PRESENCE DE PROLINE 2.10^{-2} M
Hfr H	0,17	1,2
G1 (1)	1,3	2,2
G 35 - A 4 (1)	0,53	0,55
2001	0,26	0,83
2001 - 24 a(2)	0,56	1,0
Hfr OR 21	< 0,04	0,86
G 402 (3)	0,5	0,6
G 404 (3)	0,54	1,3
G 405 (3)	4,0	2,7
G 406 (3)	0,3	0,74
G 407 (3)	0,5	1,5

(1) - Mutants de la souche Hfr H
(2) - Mutants de la souche 2001
(3) - Mutants de la souche Hfr OR 21

Tableau 17 - Activité spécifique de la proline-oxydase chez différents mutants où la synthèse de l'enzyme est constitutive.

Dans cette classe, on observe que la quantité maximale d'enzyme synthétisée est, soit égale à la quantité maximale formée par la souche sauvage (G406, 2001-24a), soit nettement supérieure à celle-ci (G1, G407).

A cette première classe s'en oppose une autre où l' ddition de proline au milieu de culture, à haute concentration, ne provoque pas d'augmentation de l'activité spécifique de la proline-oxydase, bien que la valeur de cette activité soit nettement inférieure à la valeur maximale trouvée chez la souche sauvage (G402, G35-A4). Le cas de G405 est aussi celui d'une souche où la synthèse de proline-oxydase n'est pas surinductible par la proline, mais où le niveau d'activité est du moins 3 fois supérieur au niveau maximal trouvé pour la souche sauvage.

En l'état actuel des choses, il est difficile d'aller plus loin que cette simple description des différents types de mutants observés. On peut penser que cette variété reflète pour une part des différences d'origine. A supposer, par exemple, que le système de régulation en présence duquel on se trouve ici soit analogue à celui qui régit l'expression de l'opéron lactose, on sait que, dans ce cas, les mutants o^c présentent souvent le caractère surinductible, alors que les souches où la synthèse constitutive atteint d'emblée son niveau maximal en l'absence d'inducteur sont plutôt du type i^-. Il pourrait en être de même ici, mais on doit souligner qu'une catégorie de mutants reste énigmatique : celle des mutants constitutifs partiels, où la synthèse de proline-oxydase n'est pas surinductible.

Nous n'avons pas examiné si la synthèse de PCA-oxydase a lieu, elle aussi, de façon constitutive chez les mutants que nous avons isolés. Le mode d'isolement de ces mutants implique que tel est bien le cas, particulièrement quand il s'agit de mutants isolés à partir d'une souche porteuse d'une délétion lac-proB. Toutefois, cette synthèse pourrait n'être qu'apparemment constitutive et être en réalité induite par un inducteur interne fabriqué sous l'action de la proline-oxydase dont la synthèse serait, elle, réellement constitutive. Il est clair que la solution de ce problème exigerait des connaissances plus précises sur le mécanisme d'induction des deux enzymes et ceci dépend en grande partie de l'existence d'un inducteur gratuit.

2 - Croissance des souches constitutives en l'absence de proline.

La plupart des mutants constitutifs que nous avons isolés ne sont apparemment pas affectés dans le système de biosynthèse de la proline; On pourrait penser que la présence, dans la cellule bactérienne, d'une quantité massive de proline-oxydase synthétisée de façon constitutive entraîne un déséquilibre, le système de biosynthèse produisant moins de proline que la proline-oxydase n'est capable d'en oxyder dans le même temps. Une même mutation entraînerait alors la synthèse constitutive de proline-oxydase et l'auxotrophie pour la proline. Or, dans la plupart des cas, il n'en va pas ainsi. La souche G1 par exemple, qui, cultivée en présence de faibles concentrations de proline, a d'emblée une activité proline-oxydase égale à l'activité maximale induite chez le parent sauvage (HfrH), n'exige nullement la proline pour croître ; sur milieu minimal additionné de glycérol, elle croît à la même vitesse que le parent sauvage.

Il ne parait pas qu'une dérépression de la voie de biosynthèse compense dans ces souches la dérépression de la voie de dégradation. Aucun des mutants constitutifs que nous avons isolés n'excrète de la proline, et surtout, examinée chez divers mutants, l'activité spécifique de la PCA réductase parait normale (voir tableau 18).

On est donc conduit à admettre, soit que la quantité de proline synthétisée par une souche sauvage excède toujours la quantité de proline que la proline-oxydase est capable de réoxyder, quel que soit le niveau auquel se trouve règlé la synthèse de cet enzyme ; soit que, dans la cellule, la proline endogène se trouve dans un compartiment inaccessible à la proline-oxydase. De fait, il semble que la proline-oxydase n'est pas un enzyme libre dans le cytoplasme, chez E.coli B tout au moins, puisqu'après 2 heures de centrifugation à 100 000 g d'un extrait brut, toute l'activité de la proline-oxydase se trouve dans le culot de centrifugation (Franck et Ranhand (18), avec les particules ribosomales et membranaires.

On doit pourtant signaler l'observation suivante : parmi les mutants constitutifs que nous avons isolés, certains se sont révélés être en même temps auxotrophes pour la proline (5 % environ d'entre eux). A l'inverse, parmi des mutants sélectionnés pour leur exigence en proline, certains se sont révélés synthétiser constitutivement la proline-oxydase, ou, au contraire, dépourvus de

SOUCHE	PHENOTYPE	ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PCA REDUCTASE (% du type sauvage)
Hfr H	Pro^+	100
G 1	Pro^+	106
2001 - 24 a	Pro^-	1
G 401	Pro^-	90
G 402	Pro^-	104
G 403	Pro^-	71
G 405	Pro^-	1

Tableau 18 - Activité de la PCA réductase chez divers mutants synthétisant constitutivement la proline-oxydase.

SOUCHE	ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PROLINE-OXYDASE
G 405	4 , 0
r 1	3 , 3
r 2	4 , 4
r 3	3 , 5
r 4	1 , 0
r 5	3 , 3
r 6	3 , 4
r 7	2 , 4
r 8	4 , 0
r 9	2 , 4
r 10	4 , 6
r 11	3 , 0
r 12	3 , 5

Tableau 19 - Activité spécifique de la proline-oxydase de 12 mutants réverses pro^+ de la souche G 405.

La souche G 405 est cultivée dans un milieu où la proline est initialement présente à la concentration 10^{-3} M. Les mutants réverses sont cultivés dans un milieu dépourvu de proline. Dans tous les cas, la source de carbone est le glycérol, à la concentration 4 g/l.

cette activité. La question est posée de savoir si, dans tous ces cas, on a affaire à des mutants apparus à la suite d'un unique événement mutationnel, ou de plusieurs. Ce problème n'a pas encore été examiné de façon systématique. Les quelques faits suivants lui sont pertinents et sont les seuls dont nous disposions à l'heure actuelle :

a/ tous les mutants "doubles" ont été obtenus après mutagenèse à la nitrosoguanidine ou à l'EMS.

b/ la déficience qui entraîne l'exigence en proline n'est pas la même chez tous les mutants "doubles".Les souches 2001-24a et G 405 sont dépourvues de PCA-réductase active. Cette activité est au contraire normale chez les autres mutants (tableau 18).

c/ dans le cas de la souche G 405, 12 mutants réverses pro^+ indépendants ont été examinés pour leur teneur en proline-oxydase (voir tableau 19). 11 d'entre eux ont une activité spécifique constitutive sensiblement égale à celle de la souche parentale. 1 mutant paraît avoir une activité constitutive nettement diminuée.

Il serait prématuré de conclure de ces quelques données qu'une même mutation puisse entraîner à la fois une synthèse constitutive de proline-oxydase et un blocage de la biosynthèse de la proline, ou, au contraire, de rejeter totalement cette hypothèse. Un problème est en tout cas posé, dont l'importance est assez claire, puisqu'il concerne un couplage possible entre la régulation de la voie anabolique et celle de la voie catabolique.

d/ Localisation chromosomique de deux mutations constitutives.

Le caractère "synthèse constitutive de proline-oxydase" constitue un marqueur génétique d'emploi peu aisé. Ainsi qu'il a été exposé dans la section Matériel et Méthodes, aucun test n'est disponible qui permette de repérer directement sur une boîte de milieu gélosé des colonies constitutives. Le test le plus rapide consiste à détecter qualitativement l'enzyme dans un extrait brut. Utilisant cette technique pour reperer des recombinants constitutifs, nous avons pu

localiser deux mutations constitutives, celles des souches G 409 et G 411. Par la suite ces mutations seront notées : poaR .

1 - Ségrégation de la mutation de G 409 dans divers croisements.

La souche Hfr G409 est dérivée de l'Hfr OR21, après mutagenèse à l'EMS et sélection à basse température, selon la méthode indiquée plus haut. Le tableau (20) indique la répartition des recombinants constitutifs dans des croisements non interrompus (voir Matériel et Méthodes) entre Hfr G409 et diverses souches F^-.

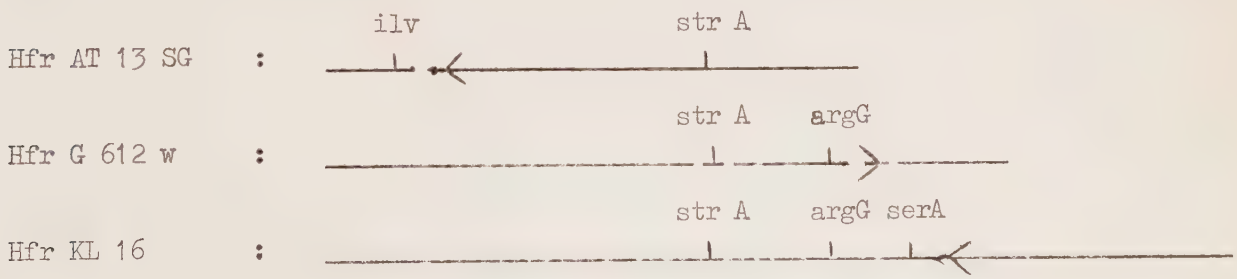
Le marqueur "poaR" n'apparait lié à aucun des 6 marqueurs de sélection utilisés dans ces croisements : leu, trp, his, purF, CysC, Arg (E, CBH). Toutefois, les résultats suggèrent que le marqueur "poaR" pourrait être localisé dans une région proche du marqueur str^r.

L'analyse des recombinants arg^+ str^r obtenus dans le croisement Hfr G409 x AB1450 pouvait être poussée plus loin, puisqu'on disposait de deux marqueurs n'intervenant pas dans la sélection : ilv et mal A.

Le tableau (21) donne le détail de cette analyse. On voit que là encore, aucune liaison n'apparait entre ces deux marqueurs et le marqueur "poaR".

2 - Croisement de souches F^- porteuses de la mutation poaR de Hfr G 409 avec différentes souches Hfr.

Trois souches Hfr ont été utilisées : Hfr AT 13 SG, Hfr G 612 w, Hfr KL 16, pour lesquels les ordres d'injection des marqueurs sont respectivement :



SOUCHE F^- utilisée	CLASSE DE RECOMBINANTS	NOMBRE DE RECOMBINANTS examinés	NOMBRE DE RECOMBINANTS PORTEURS de la mut. poa R
G 50	leu^+ str^r	48	0
	trp^+ str^r	48	0
EM 3000	pur^+ str^r	24	3
	cys^+ str^r	36	7
AB 1450	his^+ str^r	66	•
	arg^+ str^r	68	18

Tableau 20 - Ségrégation de la mutation poaR de l'Hfr G 409 dans des croisements avec plusieurs souches F^-.
(pour le génotype complet des souches, voir Matériels et Méthodes).

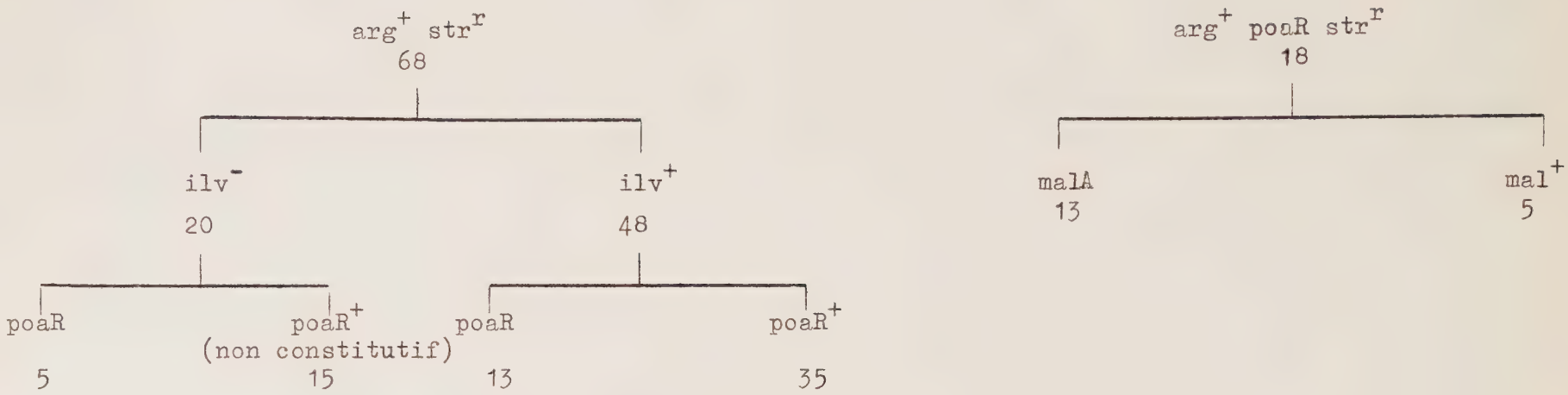
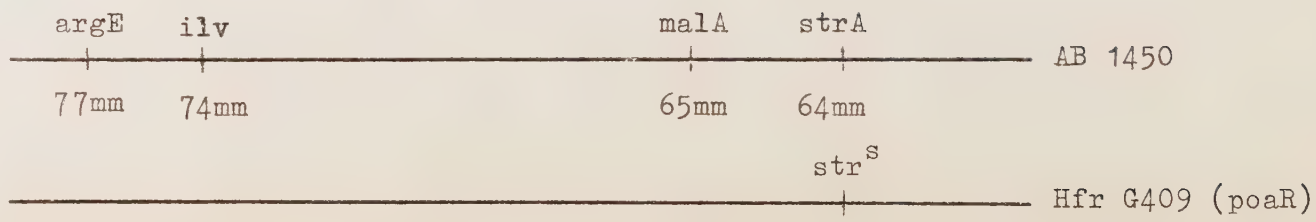


Tableau 21 - Analyse génétique des recombinants arg^+ str^r obtenus dans le croisement Hfr G409 (poaR) x F^- AB 1450



Les croisements suivants ont été effectués :

a/ Hfr G 612 w (his^- str^s) x F^- ilv^- mal A str^r poaR his^+

La souche F^- est issue d'un croisement Hfr G 409 x AB 1450. On sélectionne les recombinants ilv^+ his^+ - 100 recombinants ilv^+ his^+ sont testés pour leur résistance à la streptomycine. On trouve parmi eux : 36 recombinants ilv^+ str^r his^+ et 64 ilv^+ str^s his^+, ce qui met en évidence une liaison assez faible entre les marqueurs ilv et str A.

Le test de constitutivité de la proline-oxydase est alors pratiqué sur 36 recombinants ilv^+ str^r his^+ et 36 recombinants ilv^+ str^s his^+. Les 72 recombinants testés ont tous le marqueur poaR.

On conclut que le marqueur "proline-oxydase non constitutive", porté ici pour la souche Hfr, n'est pas l'un des marqueurs injectés en premier par l'Hfr G 612 w.

b/ Hfr AT 13 SG (thr^- leu^- str^s) x F^- pur F arg E poaR str^r thr^+ leu^+

La souche F^- est issue d'un croisement Hfr G 409 x EM 3000.

On sélectionne les recombinants pur^+ thr^+ leu^+. Parmi 100 recombinants testés, 29 sont du type pur^+ thr^+ leu^+ str^s et 71 du type pur^+ thr^+ leu str^r.

Le test de constitutivité donne alors les résultats consignés dans le tableau (22).

Il est clair que l'allèle sauvage du marqueur poaR, porté par la souche Hfr a cette fois été transmis : 9 recombinants pur^+ str^s n'ont pas le caractère poaR. Les 36 recombinants pur^+ str^r sont du type poaR ce qui suggère une forte liaison des marqueurs str^r et poaR. Toutefois, si cette forte liaison est réelle, on n'attend pas une aussi forte proportion de recombinants porteurs de la mutation poaR parmi les recombinants pur^+ str^s (ici : 66 %).

c/ Hfr KL 16 (str^s) x F^- pur F arg^- poaR str^r

On sélectionne les recombinants pur^+ str^r. Le test de constitutivité, appliqué à 83 recombinants indique que 82 sont du type poaR, un seul n'a pas le phénotype constitutif.

TYPE DE RECOMBINANTS	NOMBRE DE RECOMBINANTS EXAMINES	NOMBRE DE RECOMBINANTS poa R
pur^+ thr^+ leu^+ str^s	29	20
pur^+ thr^+ leu^+ str^r	36	36

Tableau 22 - Analyse du croisement Hfr AT 13 SG x F^- pur F poa R str^r (cf. le texte).

Si l'on écarte l'hypothèse que ce "recombinant" provient d'une mutation réverse, deux interprétations sont possibles :

- ou bien l'allèle sauvage du marqueur poaR est injecté très tôt par l'Hfr KL 16, et la faible proportion (environ 1 %) de recombinants possèdant cet allèle s'explique par le fait qu'il est très proche de l'origine de l'Hfr.

- ou bien le marqueur est injecté très tard, d'où la faible proportion observée. Mais puisque par ailleurs le marqueur n'est pas injecté au début par l'Hfr G 612 w, il s'ensuit qu'il doit être localisé entre l'origine de l'Hfr G 612 w et les tout premiers marqueurs transmis par l'Hfr KL 16 (voir figure 13).

3 - Croisement Hfr G 409 x MR W 41.

Si la conclusion à laquelle on vient d'aboutir est exacte, on doit pouvoir mettre en évidence une forte liaison entre les marqueurs serA ou lysA et le marqueur poaR. Dans ce but, on a procédé au croisement de l'Hfr G 409 avec la souche MRW 41 (F^- serA lysA str^r). On sélectionne les recombinants ser^+ lys^+ str^r. Parmi 44 recombinants testés, 12 se sont révélés porteurs du marqueur poaR, 32 en étaient dépourvus.

Ce résultat est inattendu en ce qu'il témoigne d'une liaison serA-poaR bien plus faible que celle escomptée. Avant de le discuter, nous ferons état d'une série de transductions qui montrent que, dans certains cas au moins, on peut observer une cotransduction des marqueurs poaR et serA.

4 - Transduction du marqueur poaR

Des stocks de phage transducteur (P1) ont été préparés sur une série de mutants poaR indépendants. A l'aide de ces stocks, on a transduit la souche Hfr U 152 (serA) et on a sélectionné les transductants ser^+. Le tableau (23) fournit les résultats de ces transductions.

On constate, dans le cas de la souche G 411, une haute fréquence de cotransduction des marqueurs poaR et serA. Cette fréquence est très réduite pour la souche G1, nulle pour les autres souches testées.

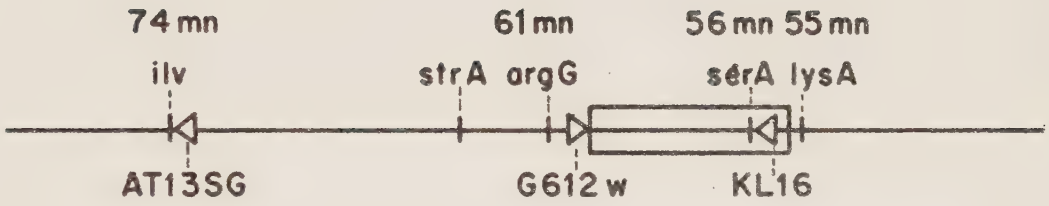


FIG.13 - Localisation probable de la mutation poaR de l'Hfr G409. A l'intérieur du rectangle est la région du chromosome où se trouve probablement localisée la mutation poaR.

DONNEUR	NOMBRE de TRANSDUCTANTS ser^+ testés	NOMBRE DE TRANSDUCTANTS ser^+ poaR
G 1	21	1
G 3	41	0
G 405	54	0
G 409	50	0
G 411	36	36
G 415	45	0

Tableau 23 - Cotransduction des marqueurs ser A et poa R. (cf le texte).

On peut évidemment penser que certaines souches testées sont en fait porteuses d'une mutation de type O^c, laquelle devrait alors se trouver dans la région où l'on a repéré les mutations qui entraînent l'inactivité de la proline-oxydase, c'est-à-dire près du marqueur pyrC (voir chap.III). La variation de la fréquence de cotransduction pour G1 et G 411 n'est peut être pas trop surprenante. Nous avons eu par ailleurs l'occasion d'observer des variations de même amplitude dans la cotransduction du marqueur lac et de différentes mutations proC. Le cas de G 409 est plus difficile. Tout ce qu'on sait de la mutation poaR de cette souche indique qu'elle doit se trouver dans la région serA (donc ne pas être du type o^c). Mais si cette mutation affecte le même gène que la mutation de G 411, même si on ne peut déceler sa cotransduction avec le marqueur serA, on devrait, par croisement, trouver une forte liaison poaR-serA. On a vu, dans le croisement avec MRW 41, que tel n'est pas le cas. On peut se demander alors si cette dernière souche ne renferme pas un suppresseur, assez éloigné sur le chromosome, de la mutation poaR de G 409. Quoi qu'il en soit de cette souche, il semble qu'on puisse tenir pour acquise l'existence d'un gène cotransductible avec le gène serA, et dans lequel des mutations entraînent la synthèse constitutive de proline-oxydase.

CHAPITRE V

MUTANTS EXCRETEURS DE PROLINE

Les enzymes de biosynthèse de la proline ne semblent pas tributaires d'une régulation au niveau génétique : telle est la conclusion que, sur la base d'expériences où l'on tente, sans y parvenir, de déréprimer la synthèse du complexe PCA synthétase ou de la PCA réductase, on doit formuler. Il ne s'ensuit pourtant pas que le problème de la régulation du métabolisme anabolique de la proline soit, de ce fait, résolu. Qu'une telle régulation ait lieu est suggérée par l'existence de mutants excréteurs de proline.

Il a été indiqué que les mutants pro A et pro B d'une part, pro C d'autre part, donnent lieu à des phénomènes de complémentation nutritionnelle croisée, les mutants pro C accumulant du PCA qui, après diffusion à l'extérieur de la cellule où il a été produit, provoque la croissance d'un mutant pro A ou B, lequel à son tour fournit au mutant pro C un peu de la proline qu'il exige spécifiquement. Or, ce phénomène est d'intensité variable mais généralement faible. On peut, par exemple, procéder à une estimation semi-quantitative de cette intensité dans l'expérience suivante :

- sur une boîte de milieu gélosé contenant toutes les substances de croissance nécessaires aux souches testées, à l'exception toutefois de la proline, on étale, en surcouche, environ 10^7 bactéries de la souche PA 417 (pro A) ; puis dans la surcouche refroidie on fait des stries à l'aide d'une aiguille de platine trempée successivement dans une colonie des souches HfrH (sauvage), AB 2345 (pro C) et G 38 (mutant de la souche HfrH sur l'obtention duquel il sera ultérieurement revenu). Après une nuit d'incubation à 37° C, on observe :

  - une forte croissance des stries de la souche HfrH, mais aucune croissance de la souche PA 417 au voisinage de ces stries.
  - une faible croissance des stries de la souche AB 2345 accompagnée tout autour d'une faible croissance de la souche PA 417.

- une forte croissance de la souche G 38, avec, tout autour, une auréole très dense due à la croissance de la souche PA 417.

Ce qui peut être résumé par le tableau suivant :

	HfrH	AB 2345	G 38
Intensité de la complémentation nutritionnelle de PA 417 par différentes souches.	0	+	++++

Ainsi, entre les souches PA 417 et AB 2345 a lieu une faible syntrophie qu'on n'observe pas du tout entre les souches PA 417 et HfrH. On doit en conclure que cette dernière n'excrète ni PCA, ni proline, ce qui paraît d'ailleurs un peu paradoxal, si l'on songe qu'avec le peu de PCA fourni par la souche AB 2345, la souche PA 417 est capable de faire assez de proline pour croître et autoriser, faiblement il est vrai, la croissance d'AB 2345. En revanche, G 38 fait croître intensément PA 417, en raison sans doute d'une forte excrétion de PCA ou de proline, ou des deux. G 38 ne diffère de la souche HfrH que par une mutation, qu'on peut appeler mutation de régulation puisqu'elle entraine un dérèglement du système de production de la proline. C'est pourquoi, de façon générale, nous noterons une telle mutation par le symbole R^-.

C'est par hasard que nous avons isolé un premier mutant excréteur, obtenu du reste sous forme d'un double mutant (pro A, R^-). (C'est la souche G7, dont il sera question plus loin). Dès lors que l'existence de tels mutants étaient révélée, il devenait indiqué, pour étudier leurs propriétés génétiques et biochimiques, de les rechercher systématiquement. C'est ce qui est possible grâce à l'emploi d'analogues chimiques de la proline.

A - OBTENTION DE MUTANTS EXCRETEURS DE PROLINE.

Ces mutants peuvent être sélectionnés directement comme résistants à des analogues de la proline qui exercent sur la croissance de la souche bactérienne une inhibition réversible par addition, au milieu de culture, de l'acide aminé.

On applique ainsi la méthode inaugurée par Jacob et Cohen pour l'isolement de mutants excréteurs de tryptophane (33).

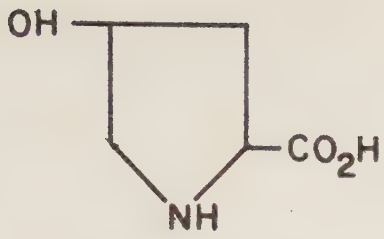
Nous avons essayé l'action sur la croissance d'E.coli K 12 d'un petit nombre de substances dont on trouvera, reproduite au tableau 24, la structure, plus ou moins étroitement apparentée à celle de la proline. Ce sont :

- l'hydroxy-L-proline,
- l'allohydroxy-D-proline,
- l'acide L-2 pyrrolidone-carboxylique,
- l'acide L-pipecolinique ("homoproline"),
- l'acide L-thiazolidine-carboxylique ("thioproline"),
- l'acide azetidine-2-carboxylique,
- la 3-4-dehydroproline,

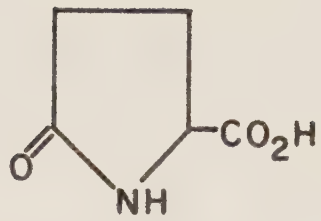
Ajoutés à une culture en milieu liquide à la concentration initiale 10^{-2} M, les quatre premiers composés de cette liste se sont avérés n'exercer aucune inhibition sur la croissance. Dans le cas de l'hydroxy-L-proline et de l'acide L-pipecolinique, nous avons vérifié que, corrélativement, la proline-oxydase n'était pas induite, ou l'était très faiblement, en présence de ces deux substances. Celles-ci ne sont en fait pas reconnues comme analogues de la proline par E.coli K 12.

En revanche, les trois autres composés ont un effet marqué. Incorporée à raison de 10 g/ml à un milieu minimal gélosé où la source de carbone était du glucose à la concentration de 8 ‰ la 3-4 déhydroproline inhibe totalement la croissance de la souche HfrH. L'effet de l'azetidine-carboxylate et du thiazolidine-carboxylate est plus complexe. Voici une expérience qui montre à la fois l'inhibition de la croissance de la souche sauvage par le L-thiazolidine-carboxylate, et la levée de cette inhibition par la proline :

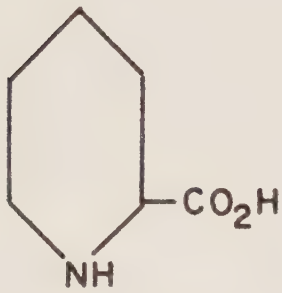
- 4 fioles contiennent un milieu de culture minimal liquide, où la source de carbone est le glycérol à la concentration 4 ‰ ; on y ajoute uniformément le L-thiazolidine-carboxylate à la concentration 4.10^{-3} M et la proline à des concentrations croissantes, respectivement 0 ; 10^{-4} M ; 10^{-3} M; 10^{-2}M. On ensemence les 4 fioles de façon identique au soir, de manière à avoir une densité



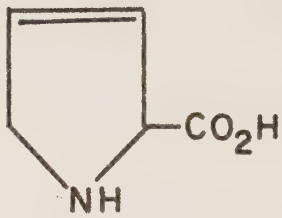
Hydroxyproline



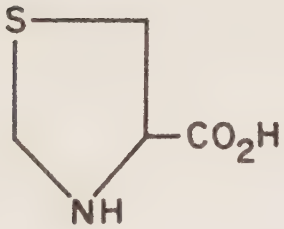
Acide 2-pyrrolidone carboxylique



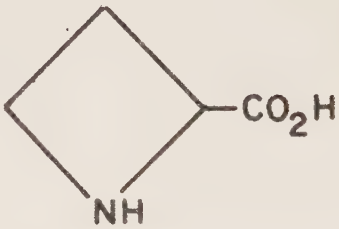
Acide pipécolinique



3-4-déhydroproline



ide thiozolidine-carboxylique



Acide azétidine-carboxylique

Tableau 24

Structure des différents analogues de la proline dont l'action sur la croissance de E.coli a été examinée.

optique initiale comprise entre 0,01 et 0,06 et on lit au matin, après une nuit d'incubation à 37° C avec agitation, la densité optique de la culture à 600 mμ. Les résultats sont consignés dans le tableau(25).

Ce tableau indique, outre l'inhibition réversible par la drogue qu'on peut lire sur la ligne consacrée à l'HfrH, que l'effet de la proline n'est pas dû à une synthèse progressivement accrue de la proline-oxydase qui détruirait le L-thiazolidine-carboxylate. En effet, la souche G 1, pour laquelle on observe une action de l'analogue très semblable, sinon identique à celle exercée sur la souche HfrH, fabrique, de façon constitutive, un haut niveau de proline-oxydase (cf. page 47). Dans l'hypothèse indiquée, on attendrait donc que cette souche soit d'emblée résistante à la thioproline, ce qui n'est pas.

Pourtant, même en l'absence de proline, l'inhibition de la croissance n'est pas totale. En fait, quand on suit la croissance d'une souche sauvage (HfrH) dans un milieu liquide où le L-thiazolidine-carboxylate est ajouté à la concentration 10^{-2} M, on constate que la croissance n'est pas bloquée, mais qu'elle se poursuit de façon sensiblement linéaire (fig. 14). Ceci rejoint une observation de Unger et de Moss (34, 35) qui ont montré en outre que le thiazolidine-carboxylate entre en compétition avec la proline au niveau de la formation de prolyl-t-RNA.

Du fait que l'inhibition de la croissance due à la thioproline n'est pas totale, il est difficile, lorsqu'on emploie cet analogue sur milieu minimal solide, en vue de la sélection de mutants résistants, d'éviter le développement d'un fond bactérien uniforme. On peut toutefois, en employant de fortes concentrations de l'inhibiteur (6.10^{-3}M) rendre ce fond assez peu intense et les colonies résistantes qui apparaissent çà et là sont alors aisément distinguées.

L'azetidine-carboxylate, dont il a été montré, à l'aide de systèmes de synthèse de protéines fonctionnant in vitro, qu'il est incorporé dans les protéines (36), présente ce même caractère de ne réaliser qu'une inhibition partielle de la croissance, selon des modalités différentes, toutefois, de celles qu'on observe avec la thioproline. Ajouté, à la concentration 10^{-3} M, au moment de l'inoculation, à une culture d'HfrH ensemencée au soir dans les conditions habituelles (voir Matériels et Méthodes) (l'aliment carboné étant le glucose à la concentration 4 ‰), l'azetidine-carboxylate entraîne, dans un premier temps, une inhibition complète de la

CONCENTRATION initiale en PROLINE	0	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-2} M
Hfr H	0,720	0,684	5,9	7,3
G 1	0,558	0,474	5,2	7,3

Tableau 25 : Croissance d'E.coli K 12 dans un milieu où la thioproline est ajoutée initialement à la concentration 4.10^{-3}M, et la proline, à des concentrations croissantes.

Les nombres representent les densités optiques lues dans un spectrophotomètre Zeiss à 600 mμ.

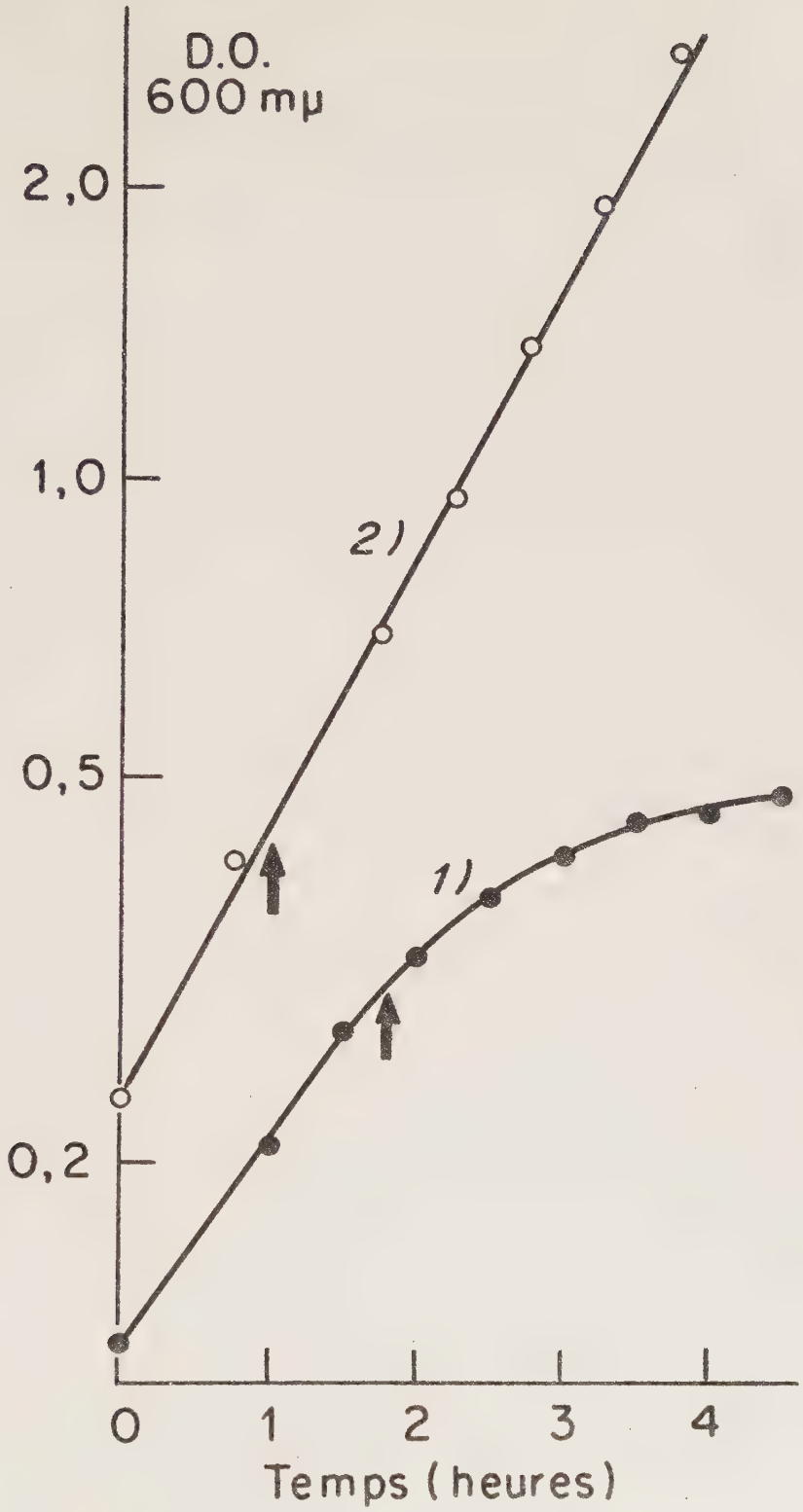


FIG.14 - Croissance, en présence de L-thiazolidine-carboxylate 10^{-2}M, (ajouté aux temps indiqués par la flèche) de la souche Hfr H (1) et de G 38 (2) (mutant résistant dérivé de l'Hfr H). La source de carbone est le glucose à la concentration 4 g/l.

croissance, et, après une nuit d'agitation à 37° C aucune augmentation de densité optique de la culture bactérienne n'est décelable. En outre, cette inhibition est totalement levée par la proline ajoutée, au moment de l'ensemencement, à la concentration 10^{-3} M. Comme dans le cas de la thioproline, il ne paraît pas que cette levée de l'inhibition soit due à une destruction de l'analogue sous l'effet de la proline-oxydase dont la présence est induite par la proline. Nous avons en effet vérifié que chez un mutant dépourvu de proline-oxydase (G 19), la proline conserve ce même effet, dû très vraisemblablement à une compétition qui s'exerce entre l'acide aminé "normal" et son analogue, au niveau de l'incorporation dans les protéines. Pourtant, une "adaptation" se produit à la longue, et, après 24 heures d'agitation en présence de la drogue et sans proline, la culture se développe normalement et il ne paraît pas que ceci soit le fait de quelques rares mutants résistants initialement présents. On observe en effet que 10^5 bactéries non entraînées, étalées sur une boîte de milieu minimal gélosé additionné d'azetidine carboxylate à la concentration 10^{-2} M, fournissent après 48 heures d'incubation à 37° C un tapis bactérien continu. Il semble donc bien que l'ensemble des bactéries se développe en définitive.

Ceci rendait difficile l'obtention de mutants directement résistants. On y arrive cependant de la manière suivante : sur la gélose (dépourvue de proline) d'une boîte de Pétri, on dépose une goutte d'une suspension, en milieu 63, de bactéries (de densité d'autant plus élevée que la fréquence présumée des mutants résistants qui s'y trouvent est plus basse), puis, au milieu de la goutte, quelques milligrammes d'azetidine-carboxylate cristallisé. On réalise ainsi localement une très haute concentration en l'analogue. Les bactéries se développent en une plage continue, cernée par un anneau plus épais. Ça et là dans la plage, des papilles émergent et, à partir de celles-ci, on peut isoler des mutants résistants.

Les conditions d'obtention des mutants résistants étant déterminées, une sélection comporte alors les opérations suivantes.

Un clone fraîchement réisolé, provenant de la souche à partir de laquelle on a choisi d'isoler des mutants, est soumis à l'action d'un mutagène, selon la méthode habituelle (voir Matériels et Méthodes). Après mutagenèse, environ 10^8 bactéries sont inoculées dans 1 ml de milieu L et on laisse la croissance se poursuivre

jusqu'au plateau, de manière à permettre la ségrégation d'éventuelles mutations récessives. (Si l'on désire obtenir des mutants spontanés, on ensemence simplement, à partir d'un clone fraîchement réisolé, 1 ml de milieu L, et on laisse la culture croître jusqu'au plateau). Après achèvement de la croissance, la culture est centrifugée, lavée une fois dans du milieu 63 afin d'éliminer toute trace de proline, et remise en suspension dans ce même milieu. Cette suspension est alors étalée sur boîtes de milieu minimal gélosé, additionné de l'analogue choisi, à raison d'environ 10^8 bactéries par boites dans le cas d'une culture mutagénisée, et d'environ 2.10^9 bactéries par boite pour une culture non mutagénisée. Après 48 heures d'incubation à 37° C, chaque boite contient de quelques dizaines à quelques centaines de colonies bien développées. Pour un clone initial donné, on réisole, par la méthode des stries, environ 10 colonies, sur milieu complet. Le phénotype d'une colonie de chaque réisolat est déterminé. Chaque colonie présentant le phénotype excréteur (cf Matériels et Méthodes) est réisolée une nouvelle fois sur milieu complet. Après un nouveau test d'excrétion, on garde, à partir d'un clone initial donné un seul mutant excréteur, de manière que tous les mutants étudiés soient indépendants.

La plupart des mutants que nousavons utilisés ont été obtenus comme résistants au L-thiazolidine-carboxylate, composé commercial (à la différence de la 3-4 déhydroproline) bon marché, et d'emploi plus commode que l'azetidine-carboxylate. Les mutants résistants obtenus dans ces conditions peuvent être rangés en trois classes, selon qu'ils fournissent un test d'excrétion d'intensité forte, moyenne ou nulle. Nous ne nous sommes intéressés qu'aux mutants des deux premières catégories, mais on doit remarquer que ceux de la troisième sont vraisemblablement, au moins pour certains d'entre eux, des mutants déficients en proline-perméase (37).

Jusqu'à présent, nous avons parlé de mutants excréteurs sans préciser autrement la nature du produit excrété. Il est temps d'indiquer que tous les mutants que nous avons examinés ont été testés avec une souche dotée d'une mutation pro C comme souche indicatrice. Une telle souche répond, pour autant qu'on le sache, à la seule proline et nous considèrerons donc que les mutants qui fournissent avec une telle souche un test d'excrétion positif sont en fait excréteurs de proline. La nature du produit excrété n'a cependant jamais été déterminée directement.

B - LOCALISATION DES MUTATIONS R^-.

a/ 33 mutants R^- spontanés, indépendants, isolés à partir de l'HfrP4x6 (1) ont été croisés avec une souche F^- dotée d'une mutation pro A (G 6) selon le schéma :

$$\text{HfrP4x6 } (R^- \text{ pro}^+ \text{ str}^s) \times F^- (R^+ \text{ pro A str}^r),$$

en vue de déceler une éventuelle liaison de la mutation R^- avec la région pro A - pro B. Les croisements, effectués selon l'ordinaire (voir Matériels et Méthodes) sont étalés après 60 minutes de mise en contact des souches mâle et femelle à la dilution 10^{-2}.

On effectue une sélection des recombinants $\text{pro}^+ \text{ str}^r$. L'examen des boites de sélection révèle dans tous les cas une forte proportion (constamment supérieure à 50 %) de colonies R^- parmi la population des recombinants. Ces colonies sont reconnues grâce à la présence, autour d'elles, d'une auréole de microcolonies pro A dont la croissance témoigne de l'excrétion de proline dans le voisinage du recombinant.

La liaison, ainsi révélée, entre la mutation R^- et la région pro A a été déterminée avec quelque précision, ainsi que la liaison R^--pro B, pour cinq mutants R^-. On compte pour cela le nombre de recombinants $\text{pro}^+ R^- \text{ str}^r$ parmi la population totale de recombinants $\text{pro}^+ \text{ str}^r$. Le tableau (26) consigne les résultats.

On observe partout une forte liaison entre les mutations R^- et pro B. (Le croisement G96 x G12 semble, il est vrai, faire exception à cette règle mais dans ce cas le comptage porte sur une nombre restreint de recombinants et pourrait ne pas être très significatif). On remarque en outre que la liaison R^- Pro A est systématiquement et notablement inférieure à la liaison R^- Pro B. L'interprétation la plus probable de ce résultat nous paraît être la suivante.

Il a été indiqué (voir p.33) que l'HfrP4x6 transmet les marqueurs pro A et pro B avec moins d'efficacité que, par exemple, les marqueurs thr - leu, en raison, vraisemblablement, de l'extrême proximité de l'origine de cet Hfr par rapport aux gènes pro A et pro B.

(1) Ce sont les souches G60, G62, G63, G64, G65, G66, G68, G69, G70, G71, G73, G74, G75, G77, G78, G79, G80, G81, G83, G84, G86, G87, G88, G90, G92, G93, G94, G95, G96, G97, G98, G99,G100.

Croisement	Nombre de recombinants pro^+ str^r examinés	Nombre de recombinants R^- pro^+ str^r	$\frac{R^-}{R^- + R^+}$
G 60 x G 6 (pro A)	170	99	0,57
G 60 x G 12 (pro B)	118	101	0,86
G 62 X G 6	127	73	0,57
G 62 x G 12	105	92	0,88
G 64 x G 6	150	87	0,58
G 64 x G 12	45	41	0,92
G 96 x G 6	130	97	0,74
G 96 x G 12	18	10	0,6
G 100 x G 6	467	308	0,66
G 100 x G 12	63	55	0,87

Tableau 26 : Liaison entre, d'une part, 5 mutations R^- (entraînant le phénotype excréteur de proline) et, d'autre part, une mutation proA et une mutation pro B .

Faisons l'hypothèse que la mutation R^- est située entre le cistron pro A et l'origine de l'HfrP4x6, et peut-être même dans le cistron pro B. Dans le croisement avec la souche G6 (pro A) on attend alors que, des deux crossing-over nécessaires pour intégrer l'allèle pro A sauvage de l'Hfr, celui qui est situé entre cet allèle et l'origine de l'Hfr passe avec une chance à peu près équivalente d'un côté ou de l'autre de la mutation R^-. D'où la fréquence assez proche de 1/2 du rapport $\frac{R^-}{R^- + R^+}$. Dans le croisement avec la souche G12 (pro B), la distance entre l'allèle R^- et l'allèle pro B redevient faible au regard de celle qui sépare l'allèle R de l'origine de l'Hfr, le crossing-over 2 (voir fig. 15) est plus fréquent que le crossing-over 1 et une forte liaison R^- pro B apparaît alors.

On est donc amenérà proposer, pour les mutations R^-, une localisation très proche de pro A et pro B, vraisemblablement entre pro A et l'origine de l'Hfr P4x6, peut être dans le cistron pro B lui-même.

b/ Cette hypothèse trouve quelque appui dans l'étude du mutant G7 dont il va être question désormais.

Ce mutant, dérivé de la souche 2001c après mutagenèse à la nitrosoguanidine, a été obtenu, au cours d'une sélection à la pénicilline, comme mutant auxotrophe pour la proline. Un croisement avec l'HfrP4x6, interrompu à 30 minutes et étalé sur un milieu qui sélectionne les recombinants pro^+ str^r révèle :

- que ce mutant fournit avec l'HfrP4x6 des recombinants précoces, ce qui signifie qu'il est affecté d'une mutation pro A ou pro B.

- que parmi les recombinants pro^+ str^r il se produit une ségrégation de colonies R^- (phénotype excréteur) et R^+, ce qui montre que la souche G7 est porteuse de deux mutations pro^- et R^-.

La mutation pro^- est complémentée par l'épisome F lac^+ pro^+ A pro^- B, et non par l'épisome F lac^+ pro^- A pro^+ B ce qui achève l'identification de G7 comme double mutant pro A-R^-.

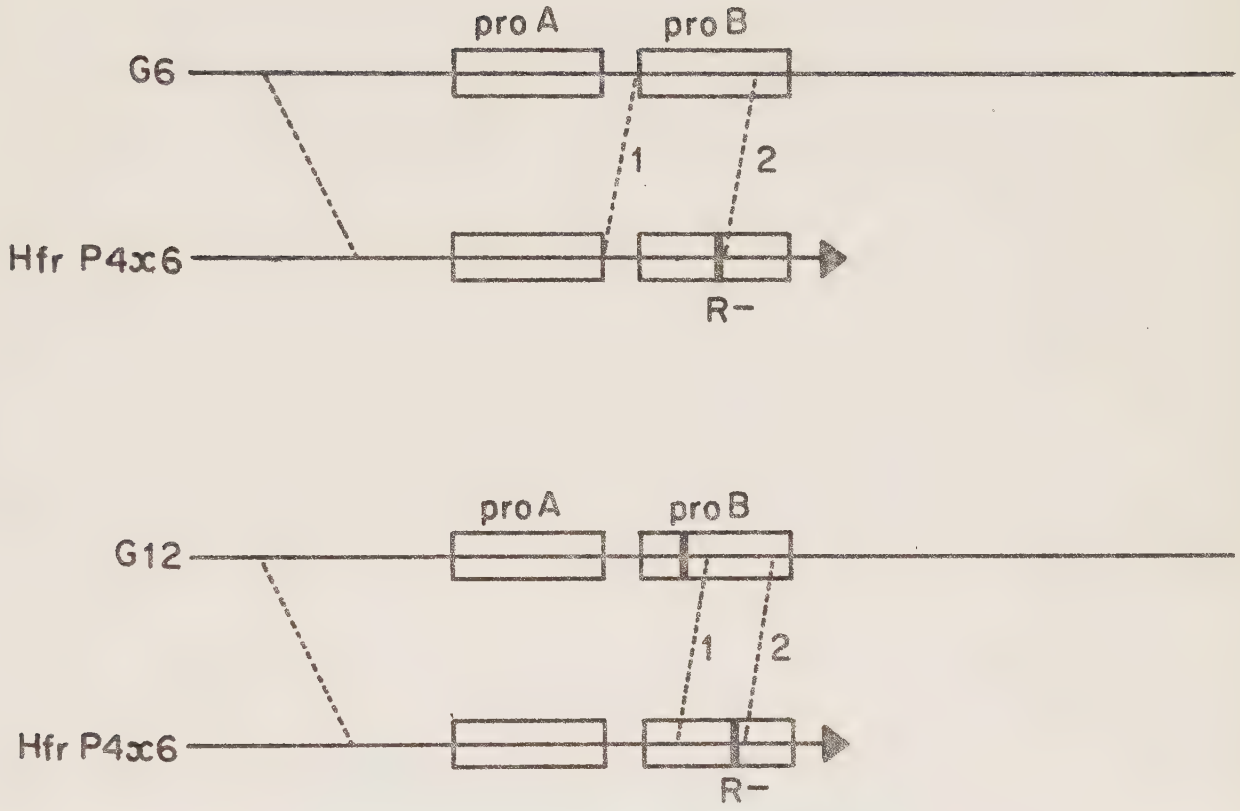


FIG. 15 - Localisation probable des mutations R^-.

On peut alors se proposer d'examiner si, par des croisements interrompus à des temps variables, on obtient des renseignements sur l'ordre relatif de ces mutations. On ne peut évidemment effectuer une sélection directe des recombinants R^+ str^r indépendamment de l'allèle pro A dont ils sont porteurs, mais on peut observer comment varie, à mesure que se déroule le croisement, la fréquence des recombinants pro^+ R^+ str^r parmi la population totale des recombinants pro^+ str^r.

On a donc pratiqué les deux croisements :

HfrP4x6 (R^+ str^s) x G7 (thr^- leu^- proA R^- str^r)

et

HfrP31 (R^+ str^s) x G7

(Pour l'HfrP31, l'entrée des marqueurs se fait selon : ←————————————)
lac pro A thr-leu

Dans les deux cas, on a suivi l'apparition des recombinants pro^+ str^r et thr^+ leu^+ str^r, et parmi les recombinants pro^+ str^r on a déterminé la fréquence $\frac{R^-}{R^- + R^+}$.

Les résultats représentés par les graphiques des fig. 16 et 17 permettent d'observer "l'effet de tête", déjà décrit (voir p. 33) de l'HfrP4x6 à l'égard de l'intégration du marqueur pro A. Par ailleurs, dans les 2 croisements, la fréquence $\frac{R^-}{R^- + R^+}$ est constante au cours du temps (ce qui tend à suggérer que le marqueur R est injecté antérieurement au marqueur pro A) mais de valeur très différente dans l'un et l'autre croisement :

- 2 % en moyenne dans le croisement avec l'HfrP31, ce qui indique une très forte liaison R-proA,
- 50 % en moyenne dans le croisement avec P4x6. La liaison R - proA semble avoir disparu. On ne peut pourtant supposer que le marqueur R est situé sur le chromosome loin au-delà du marqueur pro A, car alors la fréquence $\frac{R^-}{R^- + R^+}$ ne serait pas constante parmi les recombinants pro^+ str^r (pendant un certain temps, <u>aucun</u> de ces recombinants n'aurait reçu le marqueur R^+ de l'Hfr).

Fig. 16 - Croisement interrompu à temps variables, entre l'Hfr P4x6 et la souche G 7 (R^- proA).

- O - : recombinants pro^+ str^r

- ▲ - : recombinants thr^+ leu^+ str^r

- Δ - : rapport $\frac{R^-}{R^- + R^+}$

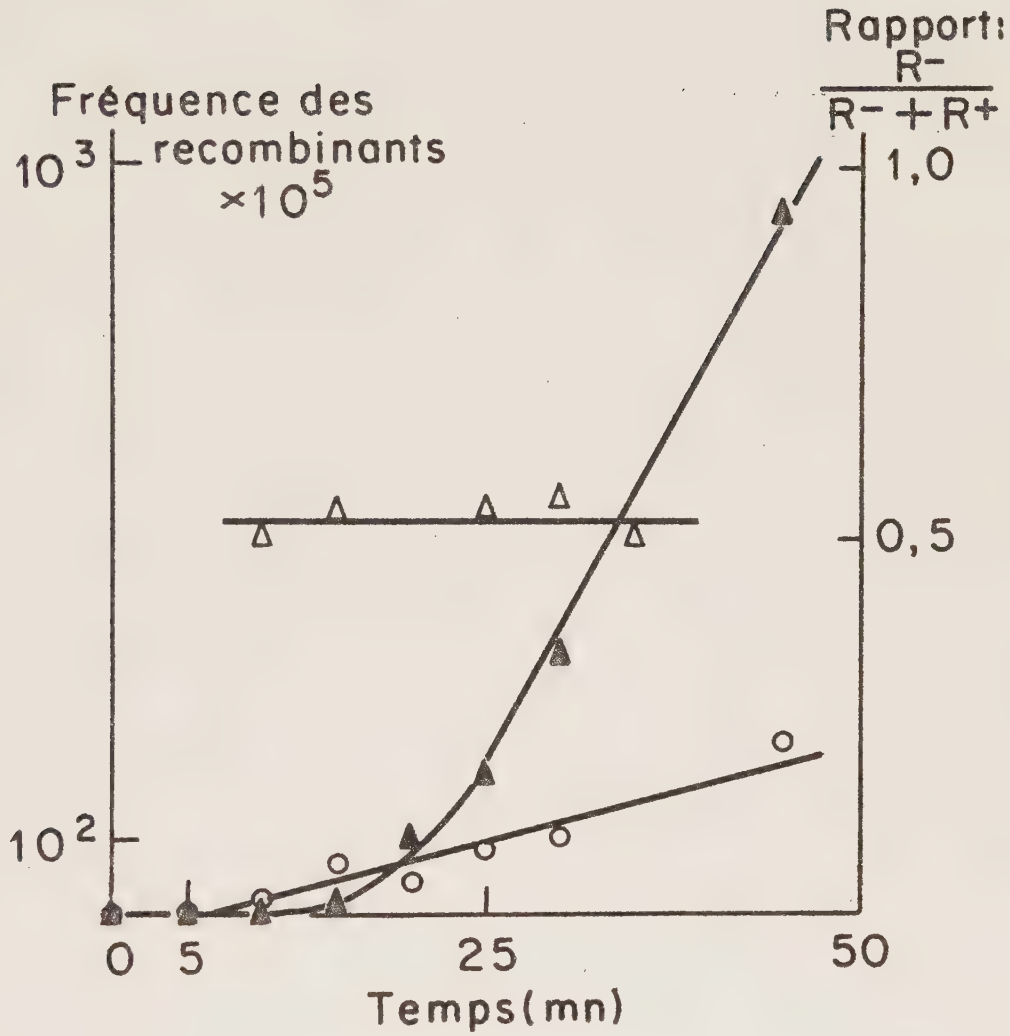

Rapport:
R-
R- + R+
Fréquence des
recombinants
×10^5
10^3
10^2
1,0
0,5
0
5
25
50
Temps(mn)

FIG. 16

Fig. 17 - Croisement interrompu à temps variables entre l'Hfr P 31 et la souche G 7 (R^- pro A).

- O - : recombinants pro^+ str^r

- ● - : recombinants thr^+ leu^+ str^r

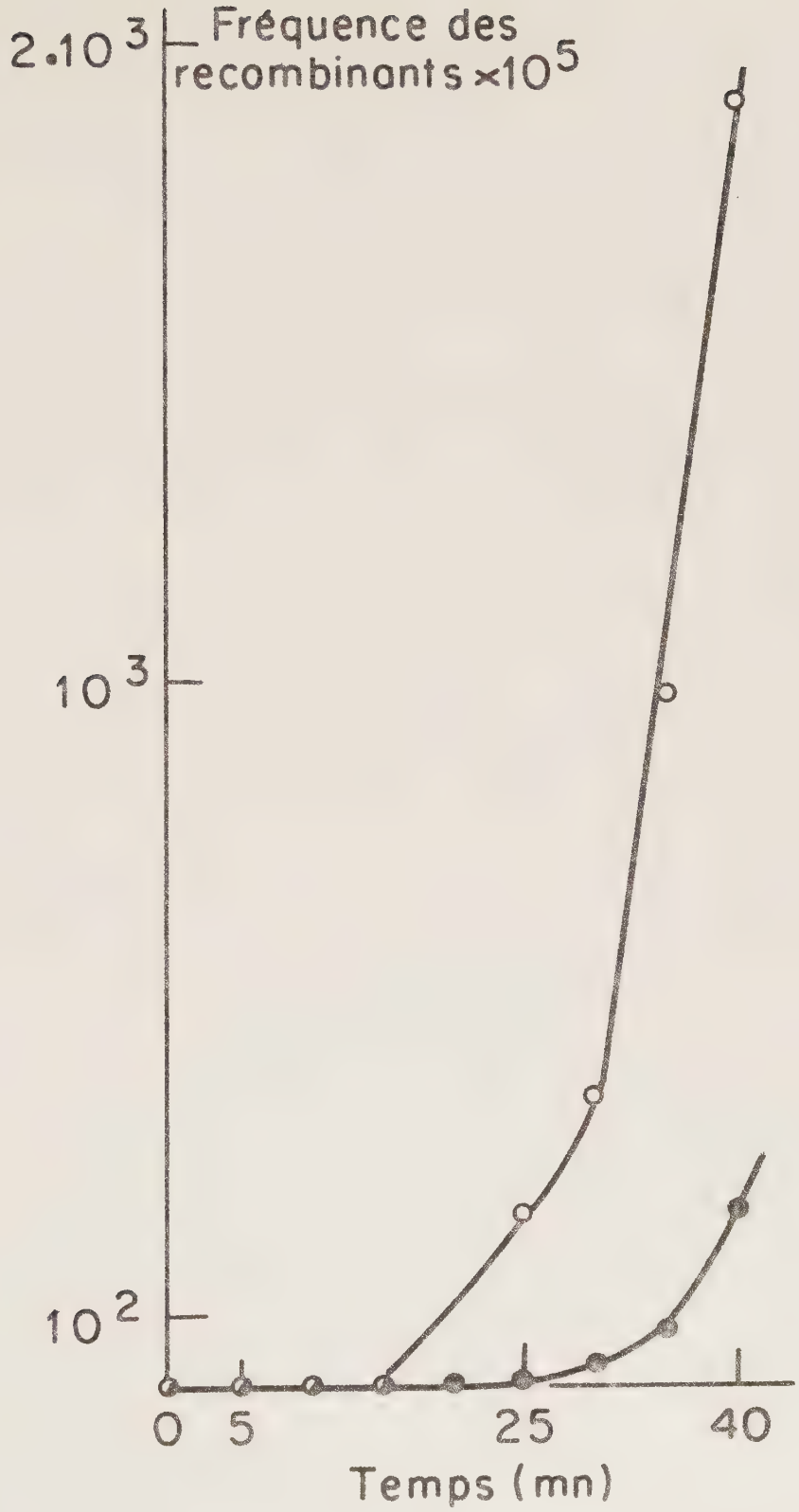
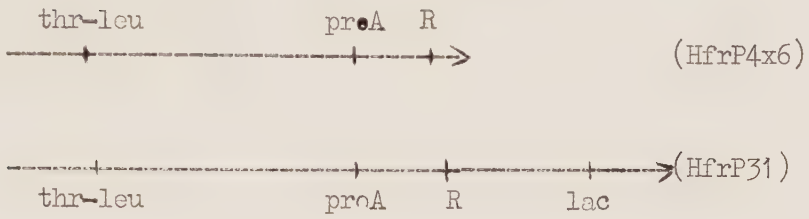

Fréquence des recombinants ×10^5
2.10^3
10^3
10^2
0
5
25
40
Temps (mn)

FIG. 17

Les deux observations se réconcilient si l'on admet les séquences de marqueurs :



R est très lié à pro A. Son extrême proximité avec l'origine de l'HfrP4x entraîne une mauvaise intégration de ce marqueur dans les croisements avec cet Hfr, avec pour conséquence une diminution apparente de la liaison R - proA.

On retrouve bien le même ordre, pour ces deux mutations, que celui proposé plus haut.

c/ Si les mutations R sont très liées aux mutations proA et proB, il y a chance qu'elles soient cotransductibles. Nous allons voir que tel est bien le cas.

Deux types d'expériences réciproques ont été réalisées. D'une part, des souches R^+ dotées d'une mutation pro A ou pro B ont été transduites pour le caractère pro^+ par un phage P_1 développé sur une souche $pro^+ R^-$:

$$P_1 \ (pro^+ R^-) \Longrightarrow pro^-_{A,B} \ R^+$$

On examinait alors si des transduits pro^+ étaient aussi porteurs de l'allèle R^-.

D'autre part, la souche G7 (proA R^-) a été transduite pour le caractère pro^+ à l'aide d'un phage développé sur une souche $pro^+ R^+$:

$$P_1 \ (pro^+ R^+) \Longrightarrow proA \ R^-.$$

On examinait alors si des transduits pro^+ étaient aussi porteurs de l'allèle R^+.

Le premier type d'expérience a été effectué avec, comme donneurs, les mutants R^- suivants : G35, G36, G37, G38, G39, G40, G42. Les souches pro^- utilisées comme receveuses ont été : X 462, X680, G8 (mutants ProA) ; X 278, X 474, G12 (mutants pro B). Dans tous les cas, les boites de transduits révélaient au premier examen qu'une large fraction des colonies pro^+ étaient dotées du phénotype excréteur, ce qui indiquait une cotransduction des marqueurs Pro et R.

Le tableau (27) consigne les résultats quantitatifs obtenus avec trois mutants R^-, après que les transduits eussent été retestés pour le caractère excréteur. On voit que dans tous les cas, le pourcentage de cotransduction est très élevé. Seules les valeurs obtenues lorsqu'on transduit les souches G8 et G12 par un phage provenant de G38 ou G39 font quelque peu exception à cette règle. Ce pourrait être le reflet d'une mauvaise intégration des marqueurs dans ces deux souches ; pourtant les résultats de la transduction par un phage développé sur G 42 ne confirment pas cette hypothèse. Quoi qu'il en soit, ces résultats ne pourraient être utilisés pour déterminer des distances entre les marqueurs pris deux à deux. Nous considèrerons simplement qu'ils indiquent l'extrême proximité des mutations R et pro A ou pro B. En fait, les mutations R pourraient se trouver localisées dans l'un ou/et l'autre de ces deux cistrons. Incidemment, ces résultats sont aussi une confirmation du fait que les cistrons pro A et pro B sont très proches l'un de l'autre.

La transduction de la souche G7 (pro A R^-) par un phage p_1 développé sur l'HfrH fournit un résultat similaire. Dans une expérience, parmi 370 transductants pro^+, 94 colonies R^- ont été dénombrées, ce qui fournissait un pourcentage de cotransduction $pro^+ - R^+$:

$$\frac{370 - 94}{370} \simeq 74$$

C - DOMINANCE DES MUTATIONS R^-.

L'étude de la dominance de mutations de régulation fournit souvent des indications sur la nature de ces mutations. Par ailleurs, il peut y avoir intérêt à distinguer le cas où la mutation de régulation est en position cis par rapport à des gènes de structure fonctionnels sur l'activité desquels elle exerce son effet, du cas où elle est en cis par rapport à des gènes de structure eux-mêmes mutés.

Donneur / Récepteur	G 38			G 39			G 42		
	Nbre de col.exam.	R^-	R^- pro$^+$ %	Nbre de col.exam.	R^-	R^- pro$^+$ %	Nbre de col.exam.	R^-	R^- pro$^+$ %
X 462	-	-	-	100	98	98	300	277	92
X 680	-	-	-	198	189	95,4	172	170	98,8
G 8	554	379	69	400	273	68	1069	1024	95,8
X 278	-	-	-	100	94	94	200	198	99
X 474	-	-	-	200	193	96,5	225	225	100
G 12	636	456	72	406	316	78	1358	1312	96,7

Tableau 27 - Cotransduction de trois mutations R^- (portées par les souches G 38, G 39 et G 42) avec trois mutations pro A (X 462, X 680, G 8) et trois mutations pro B (X278, X 474, G 12).

On sait, par exemple, que les mutations constitutives d'un opérateur (mutation O^c) sont définies par une dominance qui ne se révèle, justement, que dans le premier de ces cas.

Bien entendu, rien, jusqu'à présent, n'indique que les mutations R^- du système de la proline affectent le niveau de transcription des cistrons pro A et pro B (dont il n'est d'ailleurs pas prouvé qu'ils soient les gènes gouvernant la structure de deux enzymes de biosynthèse) plutôt que par exemple le niveau de transcription de pro C. Toutefois, la forte liaison qui existe entre les mutations R^- et pro A, pro B, fait qu'une condition structurale est remplie pour que les mutations R^- puissent prétendre au statut de mutation O^c de l'un ou/et l'autre de ces cistrons. C'est pourquoi, nous avons recherché si les propriétés de dominance restaient les mêmes dans les trois types de configurations diploïdes suivantes :

$$(1)\ \frac{R^-\ proA^+\ proB^+}{R^+\ proA^+\ proB^+}\ ; \qquad (2)\ \frac{R^-\ proA^-\ proB^+}{R^+\ proA^+\ proB^+}\ ; \qquad (3)\ \frac{R^-\ proA^+\ proB^-}{R^+\ proA^+\ proB^+}\ .$$

a/ La première de ces configurations génétiques est la plus aisée à réaliser et c'est elle dont nous discuterons le phénotype tout d'abord. Elle a été réalisée pour les mutations R^- des souches suivantes : G35, G36, G37, G38, G39, G40, G42. Ces souches étant Hfr, il n'était pas possible, ou du moins difficile, d'y introduire un épisome F lac^+ pro_B^+ pro_A^+. Nous avons donc construit autant de souches F^- R^- en transduisant la souche X 680 (F^- $proA^-$) pour le double caractère pro^+ R^- par différents phages P_1 développés respectivement sur chacune des souches Hfr R^-:

$$P_1\ (Hfr\ pro^+\ R^-) \Longrightarrow 680\ (F^-\ pro_A^-\ R^+)\ (\text{sélection } pro^+).$$

Il était alors possible d'introduire dans chaque souche F^- R^- l'épisome F lac^+ pro_A^+ pro_B^+ de la souche E5014. On faisait le croisement :

$$E5014\ (F',\ str^s)\ \times\ F^-\ R^-\ lac^-\ str^r\ (\text{sélection } lac^+\ str^r).$$

Une vingtaine de colonies recombinantes étaient prélevées pour chaque croisement, réisolées et testées pour l'excrétion de proline. Pour chacun des 7 croisements réalisés dans ces conditions, le résultat a été que toutes les colonies recombinantes testées excrétaient de la proline.

Avant de conclure que ces mutations R^- sont dominantes, on doit pouvoir affirmer que les colonies testées sont effectivement diploïdes, et, d'autre part, que l'allèle R^+ est bien présent sur l'épisome. Le premier point a été vérifié dans chaque cas grâce à un test de retransfert. Pour chaque croisement, trois colonies recombinantes excrétrices étaient recroisées avec la souche PA417 (F^- lac^- pro_A^-) :

$$thr^- \; leu^- \; \frac{R^- \; pro^+ \; lac^-}{FR^+ pro^+ \; lac^+} \; str^r \quad x \quad F^- \; arg^- \; his^- \; pro_A^- \; lac^- \; str^r.$$

(On sélectionnait des recombinants pro^+ str^r en présence d'arginine et d'histidine, la souche F^- étant contre-sélectionnée par son exigence en proline, la souche F' par sa double exigence en thréonine et leucine). Pour vérifier le deuxième point, on ne pouvait guère songer à rechercher une ségrégation de colonies R^+ parmi l'ensemble des descendants d'un clone recombinant de phénotype R^-. Celles-ci risquaient en effet d'être rares et il est plus aisé de repérer de rares colonies R^- parmi des colonies R^+ que l'inverse. Nous avons alors procédé de la manière suivante (cette vérification n'a été faite que dans le cas des mutations R^- des souches G37, G39, et G42).

Une colonie recombinante excrétrice était croisée avec la souche PA417 (c'est le croisement noté plus haut) et le produit du croisement étalé en surcouche en présence d'arginine et d'histidine de manière, là encore, à sélectionner les bactéries de la souche PA 417 ayant reçu l'épisome F R^+ pro^+ lac^+ de E 5014. On recherchait alors, parmi l'ensemble des colonies à bord lisse, de rares colonies recombinantes entourées d'une auréole de microcolonies : cette auréole ne pouvait provenir que de bactéries de la souche PA417 dont la croissance était rendue possible par une excrétion locale de proline. La colonie excrétrice, elle, devait provenir du développement d'une bactérie ayant reçu un épisome F R^- pro^+ lac^+ formé par recombinaison entre l'épisome et le chromosome à l'intérieur du diploïde partiel de génotype $thr^- \; leu^- \; \frac{R^- \; pro^+ \; lac^-}{F \; R^+ \; pro^+ \; lac+}$.

On vérifiait enfin que ces colonies recombinantes excrétrices étaient à leur tour capables de transférer un épisome F R^- pro_A^+ qui conférait, en même temps que le caractère pro^+, le caractère excréteur à une souche F^- R^+ pro_A^- (X 680).

Nous avons pu ainsi observer des recombinants chez lesquels avaient été intégrées sur l'épisome F lac^+ pro^+ les mutations R^- des souches G37, G39, et G 42. Ces événements se produisent à une fréquence faible, comprise entre 0,1 et 1 %. (Par exemple, dans un croisement :

$$thr^- \; leu^- \; \frac{R^- \; G42 \; pro^+}{F \; R^+ \; pro^+} \; x \; F^- \; arg^- \; his^- \; R^+ \; pro^-_{A'}$$

on trouvait, parmi 2000 colonies recombinantes pro^+ arg^- his^- 23 colonies de phénotype excréteur).

Pour ces trois mutations au moins, on est amené à penser que l'épisome de la souche E5014 porte leur allèle sauvage. Les mutations des souches G35, G36, G38 et G40 paraissent localisées en un endroit suffisamment proche de ces trois mutations, pour qu'on puisse admettre pour elles la même conclusion.

On est donc conduit à admettre que, dans la configuration

$$\frac{R^- \; pro^+A \; pro^+B}{R^+ \; pro^+_A \; pro^+_B}$$

ces mutations R^- sont dominantes.

b/ Le test de dominance des mutations R^- dans les configurations 2 et 3 soulève un autre type de difficulté.

En raison de la rareté des marqueurs génétiques connus pour être cotransductibles avec les mutations pro A et pro B, il est à l'heure actuelle très difficile de construire une souche portant deux mutations R^- et pro A ou pro B données à l'avance. Une telle construction est possible, au moins en principe, à l'aide d'un croisement du type :

$$Hfr \; R^- \; pro^+_A \; lac^+ \; str^s \quad x \quad F^- \; R^+ \; pro^-_A \; lac^- \; str^r.$$

On sélectionne les recombinants lac^+ str^r et on cherche parmi eux ceux qui ont conservé le marqueur proA (on en trouvera de 1 à 5 %. Parmi ces recombinants lac^+ pro^-_A str^r, on doit ensuite chercher ceux qui sont dotés de l'allèle R^- (moins de 1 % sont en principe dans ce cas) et comme on a affaire à une souche Pro^-, il faut pour révéler l'allèle R^- réintroduire un allèle pro^+, par exemple à l'aide d'un croisement avec l'HfrP4x6. On voit donc que la préparation d'une telle souche est très laborieuse.

Une autre solution, que nous avons adoptée, à ce problème, consiste à isoler, à partir d'une souche porteuse d'un allèle R^-, une série de mutants pro^-, quitte à vérifier, par exemple en recherchant une ségrégation (R^-, R^+) parmi la descendance d'un croisement de ces mutants avec une souche pro^+ R^+, qu'ils ont bien conservé l'allèle R^-. Cette méthode a évidemment un inconvénient. En effet, on n'est jamais absolument certain que l'apparition de la mutation pro^- se soit produite sans altérer, en quelque façon, la structure de la mutationR^- préexistante. Que l'on recherche des mutants spontanés ou des mutants obtenus après action d'un mutagène ne modifie d'ailleurs pas cette incertitude. Celle-ci impose une prudence particulière dans l'interprétation des résultats obtenus.

Nous avons appliqué cette méthode dans le cas de la souche G37. Après mutagenèse à l'éthylméthane sulfonate dans les conditions ordinaires (voir Matériels et Méthodes), une série de mutants pro^- ont été obtenus par sélection à la pénicilline. Notons qu'en dépit de deux passages successifs à la pénicilline, la proportion des mutants pro^- dans les clones mutagénisés restait faible, inférieure à 10 %, ce qui s'explique vraisemblablement par le fait que, la souche parentale excrétant de la proline dans le milieu, il est difficile, lors de l'action de la pénicilline, d'empêcher toute croissance des mutants auxotrophes pour la proline. Remarquons aussi que dans une sélection faite à partir de 5 clones indépendants, où 53 mutants pro^- possèdant encore le caractère Hfr de la souche parentale ont été examinés, aucun n'était un mutant pro C. C'est un exemple de la relative rareté avec laquelle ces mutants apparaissent dans les sélections de mutants pro^-. L'appartenance des mutants à la classe pro A ou/et pro B, ou à la classe pro C était déterminée par le niveau de recombinaison avec la délétion lac-pro-B-pro A de la souche 2000x111. Les mutants de la classe pro B pro A étaient identifiés par les tests de complémentation habituels .

3 mutants pro A et 4 mutants pro B indépendants ainsi obtenus, ont été croisés avec la souche G 21 (sélection ad^+ str^r) de manière à transférer sur une souche F^- la région pro A - pro B de ces mutants. Avec les 7 souches F^- pro^-, on pouvait alors, après avoir vérifié par un croisement avec l'HfrP4x6 (sélection pro^+ str^r) la présence dans ces souches de la mutation R^- provenant de la souche G 37, déterminer si cette mutation était ou non dominante en présence de l'épisome F lac^+ R^+ pro^+B pro^+A de la souche E5014. (On faisait les croisements F^- R^- Pro^- (A ou B) str^r x E5014 str^s ; les recombinants pro^+ str^r étaient testés pour le phénotype excréteur). Le tableau 28 résume les résultats obtenus.

La question de savoir si l'épisome F' de la souche E5014 porte bien l'allèle R^+ a déjà été discutée et il n'y sera pas revenu ici. Il apparaît donc, compte tenu des réserves que suscite la méthode employée, et que nous avons soulignées, que la mutation R^- est dominante lorsqu'elle est en position <u>cis</u> par rapport à un cistron pro B^+, mais qu'elle ne l'est plus quand elle est en position <u>cis</u> par rapport à une mutation pro B^-. En d'autres termes, l'intégrité du cistron pro B en position <u>cis</u> par rapport à la mutation R^- est indispensable pour que cette mutation soit dominante. L'intégrité du cistron pro A est en revanche indifférente.

Notons que la souche G7, dont on a vu qu'elle est porteuse d'un génotype R^- pro B^+ pro A^- fournit un résultat similaire. Après introduction de l'épisome F lac^+ R^+ pro B^+ pro A^+ de la souche E5014, le diploïde partiel obtenu a un phénotype excréteur. (Dans ce cas, les tests de présence de l'allèle R^+ sur l'épisome, du type de ceux qui ont été décrits pour les mutations des souches G37, G39, G42, ont été effectués, avec un résultat positif.)

Par ailleurs, la souche G421 est porteuse de la mutation R^- de la souche G42 et d'une mutation pro^- obtenue après passage à la nitrosoguanidine. Cette mutation, bien que complémentée par l'épisome F pro A^+ pro B^+, ne l'est ni par l'épisome F pro A^- pro B^+, ni par l'épisome F pro A^+ pro B^-. Quel que soit le statut que l'on accorde à un tel mutant (mutant polaire ? double mutant pro A^- pro B^- ?) on retient que chez lui, le cistron pro B n'est pas exprimé de façon normale. Or, on constate que là encore, la dominance de la mutation R^- n'a pas lieu. Le diploïde

$$\frac{R^-_{G42} \quad \text{pro } B^- \text{ pro } A^+}{R^+ \text{ pro } B^+ \text{ pro } A^+}$$

n'a pas le phénotype excréteur.

SOUCHE	GENOTYPE	PHENOTYPE DU DIPLOIDE $\left(\frac{R^- \; Pro^-}{R^+ \; Pro^+}\right)$
G 21 - 371	F^- R^- $proA^-$ $proB^+$	(R^-) (phénotype excréteur)
G 21 - 373	F^- R^- $proA^-$ $proB^+$	" "
G 21 - 375	F^- R^- $proA^-$ $proB^+$	" "
G 21 - 376	F R^- pro A^+ $proB^-$	(R^+) (phénotype non excréteur)
G 21 - 377	F R^- $proA^+$ $proB^-$	" "
G 21 - 378	F R^- $proA^+$ $proB^-$	" "
G 21 - 379	F R^- $proA^+$ $proB^-$	" "

Tableau 28 - Dominance de la mutation R^- de la souche G 37, en position cis par rapport à plusieurs mutations pro A et pro B.

La discussion de l'interprétation de ces résultats concernant la dominance est reportée en fin de chapitre (voir V.F. : Conclusions).

D - ENZYMOLOGIE DES MUTANTS R^-.

Ainsi que cela a été exposé dans la section Matériel et Méthodes, deux enzymes du métabolisme de la proline peuvent être dosés avec quelques précisions : la PCA-réductase, enzyme de biosynthèse, et la proline-oxydase, enzyme de dégradation. Nous avons donc examiné ce que devient le niveau de ces activités enzymatiques dans une série de mutants R^-. Le tableau (29) rassemble les résultats obtenus pour ces mutants et pour la souche parentale.

On voit qu'il ne semble pas y avoir de variations significatives du niveau de PCA-réductase dans ces souches. En revanche, on y décèle une légère augmentation du niveau de proline-oxydase. Il est probable, et nous admettrons, que ceci est dû à une "autoinduction" de ces souches pour la proline qu'elles excrètent dans le milieu extérieur, plutôt qu'à une synthèse constitutive, au sens ordinaire, de proline oxydase qui identifierait les mutants R^- comme mutants d'un gène régulateur de la proline-oxydase. On doit d'ailleurs remarquer qu'il est difficile de trancher expérimentalement entre ces deux interprétations. Dès l'instant qu'on se propose d'introduire dans la souche R^- une mutation pro^- pour empêcher l'excrétion de proline, et par conséquent, l'autoinduction si elle existe, on est voué, pour faire croître la souche R^- pro^-, à ajouter dans le milieu de culture un peu de proline qui rétablit une légère induction de l'enzyme.

Au reste, il paraît clair que cette élévation du niveau de proline-oxydase, qu'on trouve dans les mutants R^-, a une fonction économique puisqu'elle aboutit à remettre dans les circuits fournisseurs d'énergie l'acide aminé dont la surproduction eût été sans cela effectuée en pure perte.

Puisque l'activité des gènes gouvernant la PCA-réductase et la proline-oxydase ne semble pas affectée de façon directe tout au moins, par les mutations R^-, on est conduit à penser que ces dernières exercent leur action au niveau

SOUCHE	ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PROLINE OXYDASE (% de l'activité du type sauvage induit)	ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PCA - REDUCTASE (% de l'activité du type sauvage)
Hfr H (induit) (1)	100	–
Hfr H (non induit)	< 5	100
G 35	30	130
G 36	20	120
G 37	25	110
G 38	40	120
G 39	35	110
G 40	35	130
G 42	30	114
G 43	25	95
G 60	30	96
G 64	35	110
G 96	25	94
G100	25	96

(1) - La souche était cultivée en présence de glycérol (4 g/l) comme source de carbone, et de proline ajoutée à la concentration initiale de 2 g/l.

Tableau 29 - Activités spécifiques de la proline-oxydase et de la PCA-réductase chez divers mutants R^-.

du système de synthèse de PCA ("PCA synthétase"). Nous avons alors recherché :

- si l'on peut déceler une variation quantitative du taux de synthèse du PCA chez les mutants R^-.
- si, d'autre part, la sensibilité de la PCA synthétase à l'égard de la proline est modifiée chez ces mêmes mutants.

Pour ce qui est du premier point, nous avons déjà discuté, dans la section Matériels et Méthodes, dans quelle mesure la pente de la droite qui traduit l'accumulation, dans les conditions expérimentales décrites, de PCA chez un mutant dépourvu de PCA réductase, constitue une détermination du niveau d'activité "PCA synthétase".

Pour ce qui concerne le second point, on doit à Tristram et Thurston l'observation que la proline, comme d'ailleurs la 3-4 déhydroproline, bloque le système d'accumulation du PCA. La figure 18 représente d'ailleurs le phénomène : dans deux suspensions bactériennes de la souche G 269 (mutant pro C) placées dans des conditions identiques (qui sont les conditions ordinaires pour l'accumulation de PCA, voir Matériels et Méthodes) on suit la synthèse du précurseur de la proline. A la suspension n°2 on ajoute, après 20 mn d'incubation, de la proline à la concentration finale, 10^{-5}M. On voit que l'accumulation de PCA est bloquée quasi instantanément. Ce blocage très rapide, n'est donc pas dû à une répression de la synthèse de la PCA-synthétase (à supposer d'ailleurs que, dans ce système expérimental, la PCA-synthétase continue à être fabriquée au cours de l'accumulation de PCA; mais ce ne semble pas être le cas puique l'accumulation du métabolite est linéaire en fonction du temps, à moins d'admettre, mais l'hypothèse est peu probable, l'existence d'un pool constant de PCA synthétase dû à un état de régime dans lequel des quantités égales de PCA synthétase se fabriquent et se dégradent en une unité de temps). En fait, l'interprétation la plus probable de cet arrêt rapide de la synthèse de PCA après addition de proline est que l'acide aminé exerce un effet de rétroinhibition sur sa synthèse en agissant au niveau de l'un et/ou l'autre des deux enzymes qui constituent vraisemblablement la PCA-synthétase. On peut donc envisager que les mutants R^- soient des mutants où la sensibilité de la PCA-synthétase à l'égard de la proline a disparu, en tout ou partie.

Fig. 18 - Accumulation de PCA par la souche G 269.

2 suspensions cellulaires, (1) et (2), sont traitées dans les conditions indiquées dans Matériel et Méthodes. A la suspension 2, la proline est ajoutée, après 20 minutes d'incubation, à la concentration 10^{-5}M.

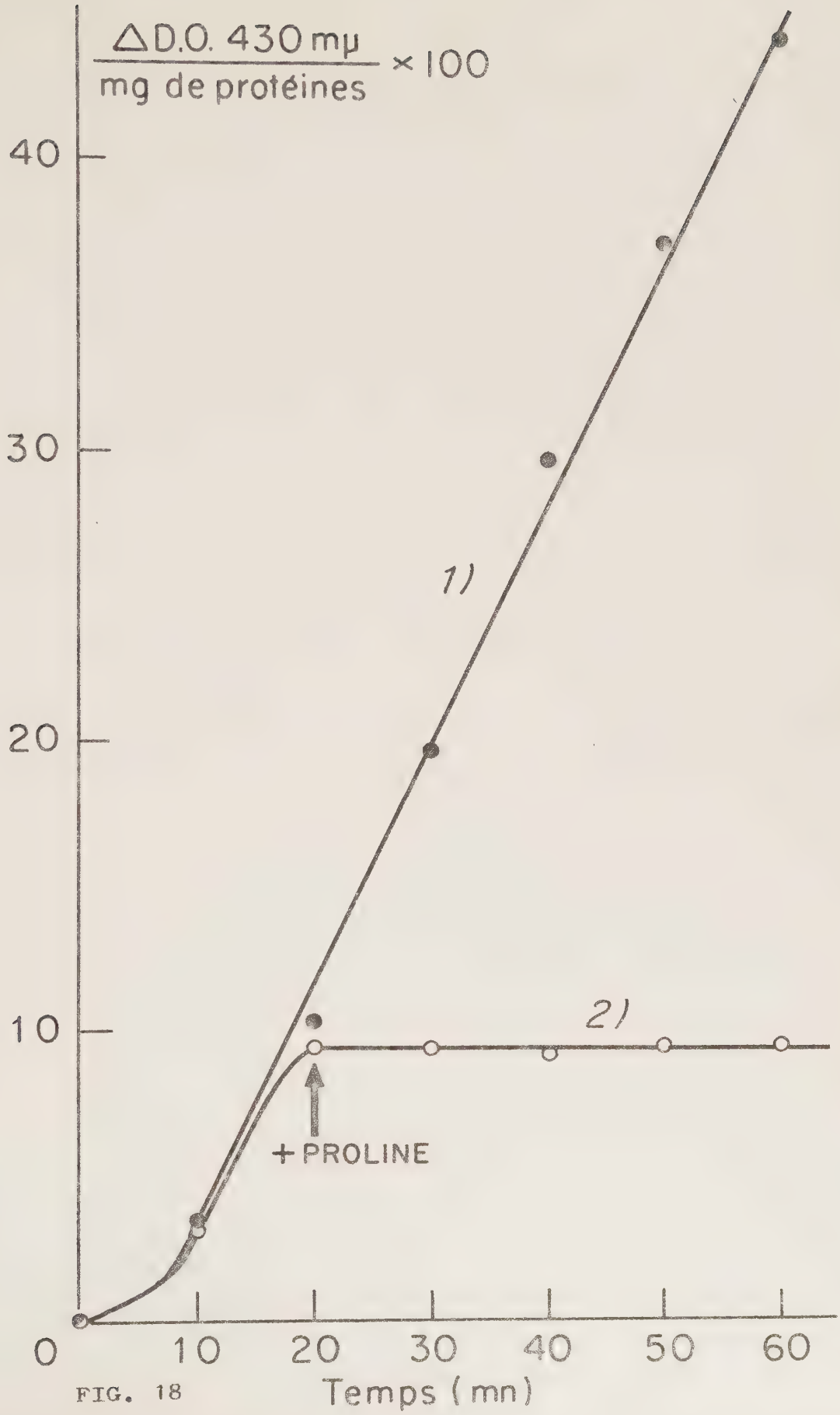

ΔD.O. 430 mμ / mg de protéines × 100
40
30
20
10
0
1)
2)
+ PROLINE
10
20
30
40
50
60
Temps (mn)

FIG. 18

Or, la détermination du taux de PCA-synthétase dans une souche R^- comporte une importante particularité méthodologique : pour que le PCA s'accumule dans cette souche, il faut qu'elle soit en outre dotée d'une mutation pro C. A priori, rien ne permet d'affirmer que le choix de la mutation pro C ne retentira pas sur les résultats. De fait, nous verrons dans la suite que ceux-ci ne sont nullement indépendants des différentes mutations pro C, même si on choisit celles-ci pour leur niveau de PCA réductase uniformément aboli. Dans ces conditions, nous nous limiterons à considérer les résultats obtenus avec un petit nombre de souches porteuses de différentes mutations R^- et d'une même mutation pro C (celle de la souche G 15). (Une exception sera constituée par la souche G34, porteuse de la mutation R^- de G39, et de la mutation pro C de AB 2345).

Indiquons d'abord comment les doubles mutants G28, G29, G30, G31 ont été obtenus. On procédait d'abord aux croisements :

$$\text{HfrH } R^- \text{ pro}^+ \text{ lac}^+ \text{ str}^s \quad \times \quad F^- R^+ \text{ lac}^- \text{ pro } C^- \text{ str}^r$$

On sélectionnait, en présence de proline, les recombinants lac^+ str^r. Pour chaque croisement, environ 150 recombinants étaient réisolés. Par réplique, on cherchait si, parmi eux, certains avaient conservé la mutation proC. On en trouvait en général de 1 à 5 dans ce cas. On introduisait alors dans ces recombinants lac^+ pro C str^r, par croisement avec la souche RV 113 un épisome F lac^+ pro C^+. Le phénotype, excréteur ou non, des recombinants pro C^+ str^r obtenus dans ce croisement était déterminé. L'excrétion de proline par ces recombinants était considérée comme témoin de la présence de l'allèle R^-, chez le recombinant lac^+ pro C str^r qui avait été croisé avec RV 113. (Une très haute proportion des recombinants lac^+ pro C str^r apparaissaient en effet porteurs de l'allèle R^-).

D'autres doubles mutants ont été construits d'une manière un peu différente (série G329, G331, etc...). La mutation R^- était d'abord isolée sur l'HfrP4x6, puis à l'aide d'un croisement avec la souche G50-183 (F^- leu^- pro_A^- pur E^- trp^- str^r) transférée sur une souche F^- (on sélectionnait les recombinants pro^+ str^r). On croisait ensuite le recombinant F^- pro^+ R^- purE str^r avec la souche G219 (mutant pro C de l'HfrOR21 isolé à cette fin) et on sélectionnait, en présence de proline, les recombinants pur^+ str^r.

Par réplique, on recherchait des recombinants pur^+ pro^- str^r ; on en trouvait de 1 à 5 % parmi les recombinants pur^+ str^r (en dépit de la liaison qui existe entre pro C et pur E ; ce faible pourcentage provient sans doute de la mauvaise intégration du marqueur pro C dans un croisement avec OR 21, due à la proximité de ce marqueur par rapport à l'origine de l'Hfr).

Envisageons maintenant les résultats obtenus avec ces doubles mutants. Les figures 19, 20 et 21 représentent l'accumulation, en fonction du temps, de PCA par les souches G15, G28 et G31, en présence et en absence de proline. Dans les trois cas, c'est la même mutation proC qui est mise en jeu, savoir celle de la souche G 15. Il est alors frappant de constater que chez les mutants R^-, la PCA synthétase échappe totalement (cas de G 31) ou presque (G28) dans les conditions expérimentales choisies, à l'inhibition par la proline.

Par ailleurs, le tableau (30) rassemble les valeurs des activités PCA-synthétase de quelques doubles mutants R^- - pro C, telles qu'on peut les déduire de la pente d'accumulation du PCA. Ces valeurs sont à comparer chaque fois avec celle qu'on obtient pour la souche porteuse de l'unique mutation pro C correspondante. Ce tableau permet alors d'observer que la présence d'une mutation R^- entraîne fréquemment une modification du niveau d'activité PCA-synthétase de la souche R^+ associée. Cette modification consiste soit en une diminution d'activité (comparer les valeurs trouvées pour G34 et AB2345, pour G15 et G30), soit en une exaltation de l'activité (comparer G28, G29, G31 d'une part, et G15 d'autre part). Là encore, la discussion de ces résultats est reportée au dernier paragraphe de ce chapitre.

E - REVERSION DES MUTATIONS PRO A^- ET PRO B^-.

A manipuler des souches porteuses de mutations pro^-, on est vite amené à observer que certains mutants fournissent fréquemment des réverses pro^+ dotés d'un phénotype excréteur de proline. C'est sur la souche χ 278 ($proB^-$) que nous avons fait cette constatation pour la première fois. Il était intéressant de rechercher s'il s'agissait d'un phénomène présenté de façon générale par tout mutant pro^-, qu'elle que fût la classe à laquelle appartînt sa mutation, ou si, au contraire, le phénomène était spécifique d'une classe particulière de mutants pro^-.

Fig. (19), (20), et (21)- Accumulation de PCA par les souches G 15, G 28 et G 31. Sensibilité de la PCA-synthétase à la proline.

Dans les trois cas, les bactéries provenant d'une culture en milieu minimal (source de carbone : glucose 4 g/l) sont partagées en 2 lots, traités de façon identique (cf Matériels et Méthodes). A l'une des 2 suspensions cellulaires, on ajoute la proline (concentration 10^{-5}M) au temps indiqué par la flèche.

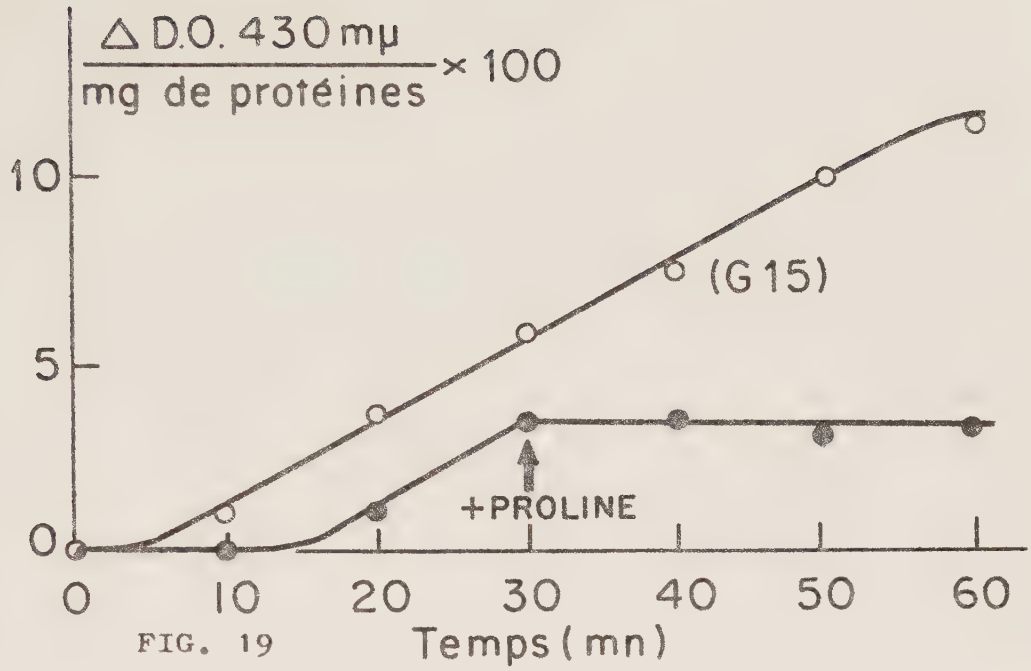

△ D.O. 430 mμ / mg de protéines × 100
10
5
0
(G 15)
+PROLINE
0
10
20
30
40
50
60
Temps (mn)

FIG. 19

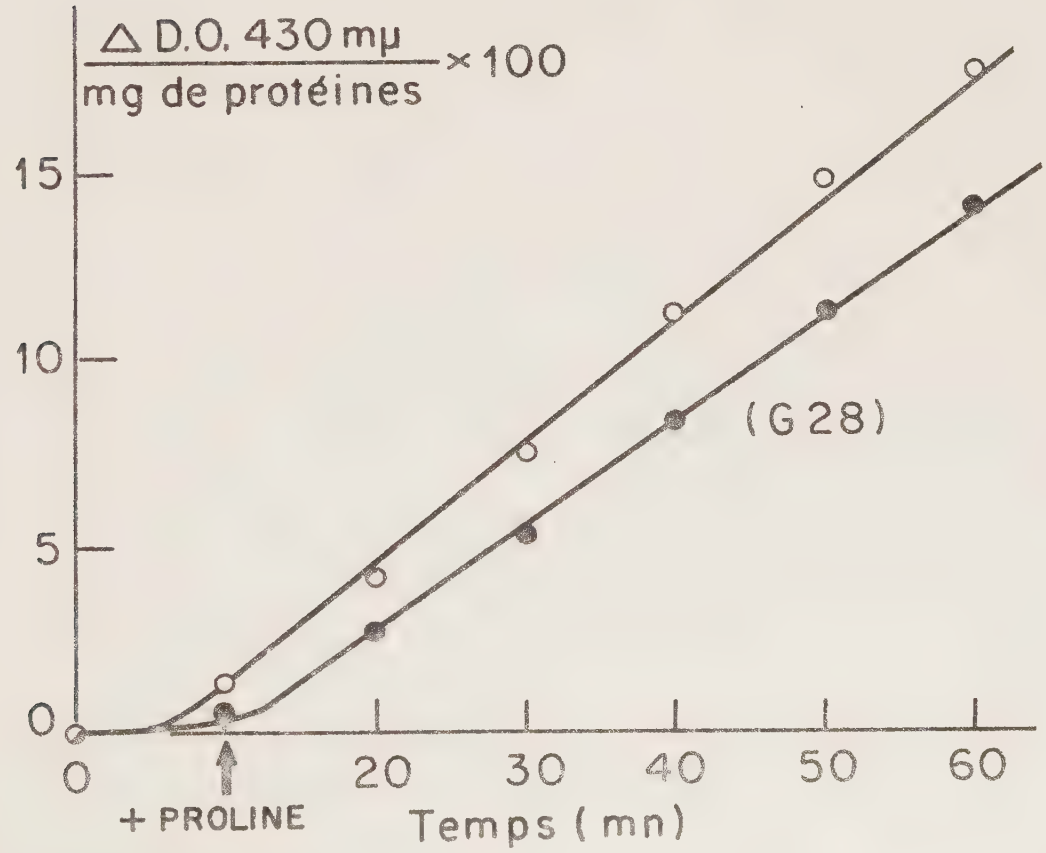

△ D.O. 430 mμ / mg de protéines × 100
15
10
5
0
(G 28)
0
20
30
40
50
60
+ PROLINE
Temps (mn)

FIG. 20

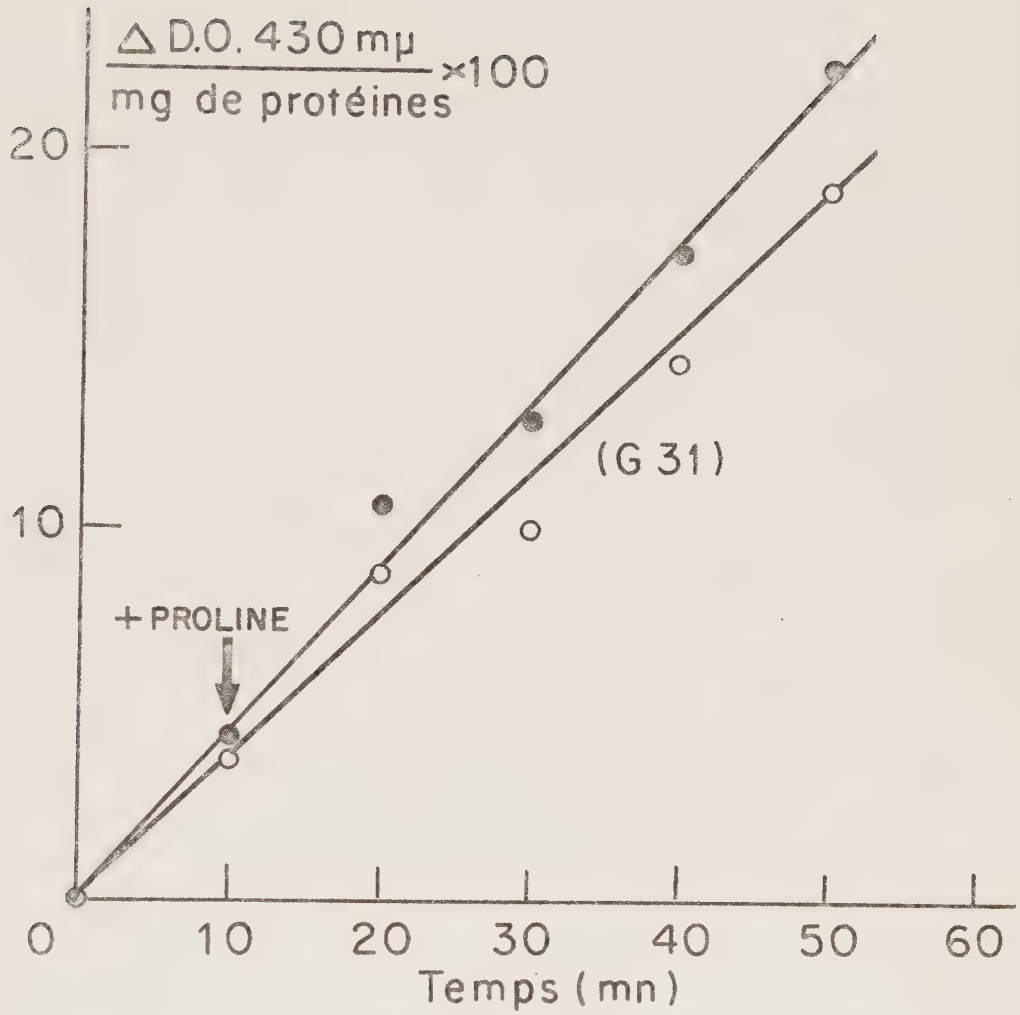

△ D.O. 430 mμ / mg de protéines ×100
20
10
0
10
20
30
40
50
60
Temps (mn)
+ PROLINE
(G 31)

FIG. 21

SOUCHE	ACTIVITE SPECIFIQUE DE la PCA - SYNTHETASE	% de l'ACTIVITE décelée chez la souche porteuse de la seule mutation pro C
G 15 (proC)	13,2	100
G 28 (R^-pro C)	19,2	140
G 29 "	24,4	185
G 30 "	11	83
G 31 "	24,2	183
AB 2345 (pro C)	13,8	100
G 34 (R^-proC)	8	57

Tableau 30 - Activité spécifique de la PCA-synthétase chez divers mutants proC, porteurs ou non d'une mutation R^-.

Dans ce paragraphe, nous ne considèrerons pas la réversion des mutants pro C, il en sera question plus loin. Nous nous préoccupons seulement de savoir si l'on peut distinguer, par l'étude de leur réversion, les mutants pro A et les mutants pro B.

Le tableau (31) rapporte une expérience où le mode de réversion au phénotype pro^+, soit spontanée, soit après action de la nitrosoguanidine, a été examiné chez 5 mutants pro A et 4 mutants pro B. Pour les clones mutagènisés (dans les conditions ordinaires, voir Matériel et Méthodes), ils étaient autorisés à croître, après action de l'agent mutagène, en milieu complet pendant une dizaine de générations. Après centrifugation et lavage dans le milieu 63, les bactéries étaient étalées sur milieu minimal dépourvu de proline, à raison d'environ 10^7 bactéries par boîte. Les clones non mutagénisés étaient simplement mis à croître en milieu complet, centrifugés et lavés en milieu 63, et étalés à raison d'environ 3.10^9 bactéries par boîte. Le tableau consigne les nombres de colonies réverses obtenues par boîte dans ces conditions, ainsi que le nombre de colonies présentant le phénotype excréteur, parmi l'ensemble des réverses pro^+.

On voit que la fréquence de réversion spontanée est faible chez les mutants considérés (la fréquence "apparente" varie ici entre 10^{-8} et 10^{-9}). La nitrosoguanidine comme il est classique, exerce un puissant effet et multiplie à peu près par 10^4 cette fréquence apparente de réversion. Mais la donnée la plus intéressante qui ressort de ce tableau est que l'aptitude à fournir des réverses pro^+ excréteurs semble bien être une caractéristique des mutants pro B, distincts en cela des mutants pro A. Nous n'avons pas poursuivi plus avant l'étude de ces réverses excréteurs, à l'exception, toutefois, de ceux de la souche 2001-6k pour lesquels nous avons vérifié qu'on pouvait intégrer sur l'épisome F lac^+ $pro\ B^+$ $pro\ A^+$ de la souche E5014 l'allèle porté par ces réverses. Il n'est bien entendu pas prouvé que tous ces réverses excréteurs forment une classe homogène pour laquelle toutes les mutations réverses ont lieu dans la région pro A - pro B (l'hypothèse d'un suppresseur éloigné sur le chromosome n'est pas exclue). Pour les réverses provenant d'une mutation dans la région pro A - pro B, il n'est pas davantage prouvé que cette mutation s'est produite dans le segment génétique où sont localisées les mutations R^- isolées directement, à partir de souches pro^+. Il est cependant tentant de considérer qu'il en est bien ainsi et, allant plus loin, de

	G 6	G 8	G 9	2001-6b	G 10	G 11	G 12	2001-6k	G 14
NOMBRE DE REVERSES induit par NG	26 ($0R^-$)	620 ($0R^-$)	55 ($0R^-$)	650 ($0R^-$)	460 ($0R^-$)	105 (85 R^-)	108 ($70R^-$)	57 (21 R^-)	149 (81 R^-)
Nombre de rév. spontanés. clone 1	5	0	0	-	1	0	12 ($6R^-$)	2	0
2	0	0	0	-	0	0	5 ($4R^-$)	1	5
3	1	2	0	300	-	-	-	3	-

Tableau 31- Réversion vers le phénotype pro^+ de 5 mutants pro A (G 6, G 8, G 9, 2001-6b, G 10) et 4 mutants pro B (G 11, G 12, 2001-6k, G 14). Pour les conditions expérimentales, voir le texte.

faire l'hypothèse que ce segment génétique où sont rassemblées les mutations R^- est le cistron pro B lui-même, puisque seules les mutations pro^- localisées dans ce cistron paraissent capables de fournir des réverses excréteurs.

F - CONCLUSIONS.

Nous discuterons maintenant l'ensemble des informations rassemblées dans ce chapitre. Elles sont de deux ordres, génétique et biochimique.

Du point de vue biochimique, le fait essentiel est que, chez les mutants R^-, l'accumulation de PCA échappe à l'inhibition qu'exerce sur cette synthèse, chez les souches R^+, la proline. Avant de conclure que les mutants R^- synthétisent une PCA-synthétase "désensibilisée" à l'égard de la proline (au sens où, par exemple, on parle de mutants où la L-thréonine-désaminase est désensibilisée à l'égard de l'isoleucine (39) on doit pourtant remarquer que l'effet de désinhibition est observé in vivo et on peut se demander si un mutant déréprimé pour la synthèse de la PCA-synthétase, plutôt que désinhibé pour l'activité de cet enzyme, n'offrirait pas le même phénomène. On connaît en effet dans le système de régulation du tryptophane par exemple, des mutants excréteurs porteurs d'une mutation qui modifie seulement le taux de synthèse des enzymes de cette voie de biosynthèse, sans affecter en rien la sensibilité de l'anthranilate-synthétase (33). Que ces mutants excrétent du tryptophane indique que la rétroinhibition, telle que le tryptophane continue à l'exercer au niveau de cet enzyme, est impuissante à endiguer cette surproduction d'acide aminé. Si, par une mutation, on provoquait une interruption de la voie de biosynthèse de manière à pouvoir doser in vivo l'accumulation d'un produit intermédiaire, on observerait probablement que cette accumulation continuerait même en presence de tryptophane.

Il est clair que la distinction entre "déréprimé" et "désinhibé" est aisée lorsqu'on dispose d'un système de dosage enzymatique in vitro. Il suffit alors d'effectuer une mesure d'activité spécifique et une mesure de l'affinité de l'enzyme à l'égard de l'inhibiteur. Ce dernier type de mesure paraît ici tout à fait interdit. Dans notre système expérimental en effet, la concentration en proline à l'intérieur des cellules où s'effectue l'accumulation de PCA est très difficile à préciser : ajoutée dans le milieu d'incubation à la concentration 10^{-5}M,

la proline est concentrée dans les cellules 50 à 100 fois par la L-proline-perméase (40) et dégradée par la proline-oxydase dont la présence est due au fait que, pour faire croître la souche R^- pro C, on a dû ajouter de la proline au milieu de culture.

Pour ce qui est de l'activité spécifique de la PCA-synthétase, on a au moins une approximation de sa valeur. Or, nous avons vu que, selon les mutants R^-, elle peut être augmentée ou diminuée. On pourrait alors être tenté de considérer que les mutants chez lesquels l'activité spécifique est augmentée sont déréprimés, mais à vrai dire, dans une faible mesure, 2 fois au maximum, et désinhibés les mutants chez lesquels l'activité spécifique est diminuée (cette diminution s'expliquerait par le fait que la mutation atteignant la structure de la PCA-synthétase aurait un double effet : désinhibition à l'égard de la proline et, par exemple, diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Un site catalytique et un site régulateur seraient modifiés par une mutation unique.)

Par ailleurs, les données obtenues sur la dominance ne permettent pas de trancher le débat. Toutes les mutations R^- sont dominantes, ce qui peut aussi bien convenir à des mutants déréprimés de type O^c, qu'à des mutants désinhibés. Mais on doit remarquer que les relations de dominance obtenues lorsqu'une mutation R^- est mise en position <u>cis</u>, successivement, par rapport à une mutation pro A et par rapport à une mutation pro B, impliquent, si l'on choisit d'interpréter les mutants R^- comme mutant o^c, certaines particularités. Il est apparu, pour les mutations de G37 et G42, que la dominance, pour être effective, exige la présence d'un cistron pro B "sauvage" en position <u>cis</u>. Ceci est attendu si l'on interprète ces mutations comme aboutissant à une désinhibition de la PCA-synthétase et localisées dans le cistron pro B lui-même, considéré comme gène de structure d'une protéine qui, dans la PCA-synthétase, porte le site régulateur sensible à la proline. Si en revanche, on classe les mutations de G37 et G42 dans la catégorie "opérateurs constitutifs, le fait que la dominance s'exprime dans le diploïde

$$\frac{R^- \text{ pro } B^+ \text{ pro } A^-}{R^+ \text{ pro } B^+ \text{ pro } A^+}$$

implique que la transcription du cistron pro B constitue l'évènement limitant dans la détermination du phénotype excréteur.

Notons qu'une possibilité n'est pas exclue : celle selon laquelle les mutants R^- seraient des mutants constitutifs d'un gène régulateur (probablement pro B) qui gouvernerait, sur le mode d'une régulation positive (puisque ces mutations constitutives sont dominantes), l'activité du gène pro A. Cette hypothèse aurait pour corollaire que les mutants négatifs du gène pro B devraient rendre silencieux le gène pro A. Il est clair que l'obtention d'une méthode de dosage in vitro des protéines issues des gènes pro A et pro B permettrait de trancher très simplement cette question.

En fait, à ce stade, il ne nous paraît pas possible de clore définitivement le débat sur la nature des mutants R^- de la région pro B. S'il fallait indiquer une préférence, disons que si les mutants excréteurs (du moins certains d'entre eux) étaient déréprimés, on ne voit pas bien pourquoi une semblable dérépression ne pourrait être obtenue en chémostat. Il semble donc plus cohérent d'admettre que les mutants R^- sont, plutôt que déréprimés, désinhibés. L'étude des mutants pro C, que nous allons envisager maintenant, contribue à jeter un peu de lumière sur ce point.

CHAPITRE VI

MUTANTS DE LA REGION pro C

La seule étude des mutants R^- de la région proB ne permet guère, on vient de le voir, d'aboutir à une conclusion définitive touchant la nature de ces mutants : s'il parait assez vraisemblable qu'il s'agisse de mutations entraînant une désinhibition de la "PCA synthétase" à l'égard de la proline, il n'est pourtant pas exclu que tout ou partie d'entre elles affectent plutôt le taux de synthèse de ce complexe enzymatique, et qu'on soit alors en présence de mutations constitutives. Dans ce dernier cas les relations de dominance observées inclineraient à penser qu'on a affaire à des mutations o^c, à moins de considérer le cistron proB comme le gène de structure d'un produit activateur gouvernant l'activité du cistron proA. De manière un peu inattendue, c'est l'étude des mutants de la région proC qui finalement éclaire le plus cette question. Les mutations de cette région se sont avérées en effet ne pas entraîner seulement l'inactivation de la PCA réductase, mais posséder aussi dans bien des cas des effets pléiotropes à la description et à l'interprétation desquels ce chapitre va maintenant être consacré.

1 - Obtention et caractérisation génétique des mutations proC.

Cette étude est menée à partir de 25 mutants proC. Les mutants que nous avons isolés l'ont été après une mutagenèse à la nitrosoguanidine ou à l'éthylméthanesulfonate. Aucun n'est spontané. C'est ici le lieu de faire remarquer que plusieurs tentatives en vue d'isoler des mutants porteurs de délétions partielles de la région proC ont abouti à des échecs. Le gène gouvernant la résistance au phage T6 étant proche du gène ProC, c'est à partir de colonies résistantes au phage T6 (tsx) apparues spontanément, qu'on tentait d'isoler de telles délétions. Parmi plus de 10 000 colonies résistantes examinées, aucune n'était auxotrophe pour la proline. Peut-être la présence d'un gène indispensable entre les régions proC et tsx est-elle responsable de cet échec. 3 des mutants que nous avons utilisés provenaient de la collection F. Jacob et avaient été obtenus après mutagenèse à l'ypérite. 2 mutants (X 478 et X 277) nous ont été aimablement procurés par le Dr Curtiss et la souche AB 2345 provient de la collection Adelberg.

L'identification de ces mutants comme porteurs d'une mutation dans la région proC a été expliquée au chapitre III : tous sont complémentables par l'épisome Flac$^+$ proC$^+$ de la souche RV 11-3. Eu égard aux propriétés pléiotropes, qui seront décrites un peu plus loin, de certaines de ces mutations, il est important de remarquer que ce type d'identification implique qu'aucune de ces souches n'est porteuse d'une double mutation proA$^-$ proC$^-$ ou proB$^-$ proC$^-$. Nous n'avons en effet jamais trouvé de mutant proA$^-$ ou proB$^-$ complémentable par cet épisome. Un deuxième critère génétique est que ces mutants proC fournissent des recombinants pro$^+$ précoces dans un croisement avec l'Hfr OR21. Cet Hfr, isolé par Curtiss, injecte précisément le marqueur proC en premier lieu, et le marqueur lac en dernier. Nous avons eu l'occasion d'observer, avec cette souche, une forte baisse de la fréquence des recombinants pro$^+$, par rapport à la fréquence des recombinants pour un marqueur situé un peu plus loin sur le chromosome (purE). Ainsi, dans un croisement : Hfr OR21 proC pur$^+$ str^s x F$^-$ pro$^+$ purE str^r, on trouve seulement 3 à 5 % de recombinants proC pur$^+$ str^r parmi la population de recombinants pur$^+$ str^r, bien que les marqueurs proC et purE soient liés. Cet effet est très semblable à celui qu'on observe, dans un croisement avec l'Hfr P4 x 6, pour les recombinants de la règion proA-proB. Il est vraisemblablement passible de la même interprétation, savoir que l'extrême proximité du marqueur proC et de l'origine de l'Hfr a pour conséquence une intégration difficile de ce marqueur.

2 - Enzymologie des mutants proC

a/ PCA réductase

Tous les mutants proC dont nous avons examiné le taux de PCA réductase se sont avérés totalement dépourvus de cette activité, dans nos conditions de mesure. Ceci signifie que tous possèdaient moins de 5 % de l'activité qu'on détecte dans les extraits de la souche 2001_c. Il n'y a sans doute pas lieu de penser qu'aucune mutation ne soit possible dans la région proC, qui entraîne seulement une inactivation partielle de la PCA réductase. D'une part, l'ensemble des mutants proC avec lesquels nous avons travaillé est assez restreint ; d'autre part, on doit se souvenir que ces mutants sont obtenus après sélection à la pénicilline, ce qui, naturellement favorise les mutants absolument négatifs.

Remarquons d'ailleurs que dans de telles sélections, nous avons toujours observé que la fréquence des mutants proC est faible par rapport à celle des mutants proA ou proB. Sa valeur est de l'ordre de 5 %, au lieu de 30 % qu'on attend si les trois gènes proA, proB et proC ont une taille comparable. Cette différence reflète peut-être le fait que le gène proC est beaucoup plus petit que les gènes proA et proB ; mais peut-être est-ce plutôt l'indication que beaucoup de mutations proC ont pour conséquence une abolition partielle de la PCA réductase et ne sont pas récupérées dans les sélections telles que nous les pratiquions.

Nous n'avons pas démontré que le gène proC est bien le gène de structure de la PCA réductase (la recherche de réverses pro^+ thermosensibles des mutants proC serait une voie possible. Nous avons en effet observé que, dans un extrait brut, la PCA réductase "sauvage" est très stable thermiquement : chauffée 3 mn à 72° C, elle conserve toute son activité). Par la suite, cette hypothèse sera implicite dans les interprétations qui seront proposées des propriétés des mutants proC. La seule justification en est que nous n'avons pas trouvé de mutants dépourvus de PCA réductase ailleurs que dans la région proC.

b/ PCA synthétase

Si les mutants proC sont dépourvus d'activité PCA réductase, on s'attend que tous accumulent le produit normalement métabolisé par cet enzyme, savoir le PCA. La considération du tableau (32), où sont consignées les activités "PCA synthétase" trouvées chez différents mutants proC montre immédiatement qu'il n'en est pas ainsi : certains mutants (G15, G22) ont un taux d'accumulation du PCA relativement élevé, d'autres (G17, G25) n'accumulent pas du tout le précurseur de la proline et, entre ces deux extrêmes, on a un éventail de possibilités, correspondant à des taux d'accumulation variables, inférieurs au taux trouvé chez le mutant G22. Nous avons déjà insisté (voir Matériels et Méthodes) sur le fait que la mesure du taux d'accumulation du PCA est une mesure très indirecte de la PCA synthétase, en sorte que les données quantitatives obtenues sont certainement à interpréter avec précaution. De ce point de vue, le fait de trouver des taux d'accumulation variant, chez divers mutants proC, de 30 à 100 % par rapport au taux trouvé chez le mutant qui accumule le plus fortement, pourrait ne pas refléter des variations d'aussi grande amplitude dans l'activité spécifique de la PCA synthétase.

SOUCHE	ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PCA - SYNTHETASE
G 15	14,5
G 16	# 1
G 17	non décelable
G 18	# 1
G 22	28,5
G 23	6,5
G 24	10,8
G 25	non décelable
G 26	7,2
G 51	non décelable
X 277	19,1
Hfr Cya 221	7,1
AB 2345	14,1

Tableau 32- Activité spécifique de la PCA-synthétase chez divers mutants pro C.

Mais on se trouve ici en présence d'un phénomène de tout ou rien et que chez certains mutants on ne puisse plus du tout déceler d'accumulation du PCA ne semble pas pouvoir être attribué à la simple imprécision de notre système de mesure.

La figure (22) montre comment se présente typiquement, chez un mutant non accumulateur, l'évolution de la quantité intracellulaire de PCA en fonction du temps, dans nos conditions expérimentales. On voit que la courbe représentant cette évolution est en fait une droite de pente faible et négative. Il y a donc lente disparition d'un matériel initialement présent en faible quantité et apte à réagir avec l'o-aminobenzaldéhyde. Ce matériel peut être du PCA dont on peut imaginer qu'il est détruit par la PCA oxydase, toujours légèrement induite dans ce système expérimental, puisque ces mutants ne peuvent croître que sur un milieu additionné de proline. Mais l'o-aminobenzaldéhyde n'étant pas spécifique du PCA, mais plus généralement du groupement aldéhyde, ce matériel est peut-être composé de métabolites variés. Incidemment, on aperçoit là une cause d'imprécision de la mesure de la PCA synthétase chez les mutants accumulateurs, pour lesquels il faudrait pouvoir estimer la quantité de matériel apte à réagir avec l'o-aminobenzaldéhyde qui a été dégradée au cours de l'expérience d'accumulation.

Il est commode de disposer d'un symbole pour désigner les mutants non accumulateurs. Nous conviendrons de les noter p^-, notation qui se propose simplement de rappeler que chez ces mutants, une certaine régulation est abolie, puisque l'activité PCA synthétase y est silencieuse. Les mutants proC peuvent donc être rangés en deux classes, p^+ et p^-, selon qu'ils accumulent ou non le PCA.

3 - Natures possibles des mutants proC p^-

L'existence des mutants p^- étant ainsi révélée, diverses hypothèses peuvent rendre compte de leur pléiotropie. Nous énoncerons d'abord trois hypothèses qui nous paraissent contredites par des données expérimentales qui seront exposées ensuite. Après quoi nous verrons qu'il y a place pour une quatrième interprétation qui semble devoir être retenue.

Avant tout, nous écarterons une solution banale selon laquelle le phénotype p^- serait la conséquence d'une mutation non spécifique du métabolisme de la proline.

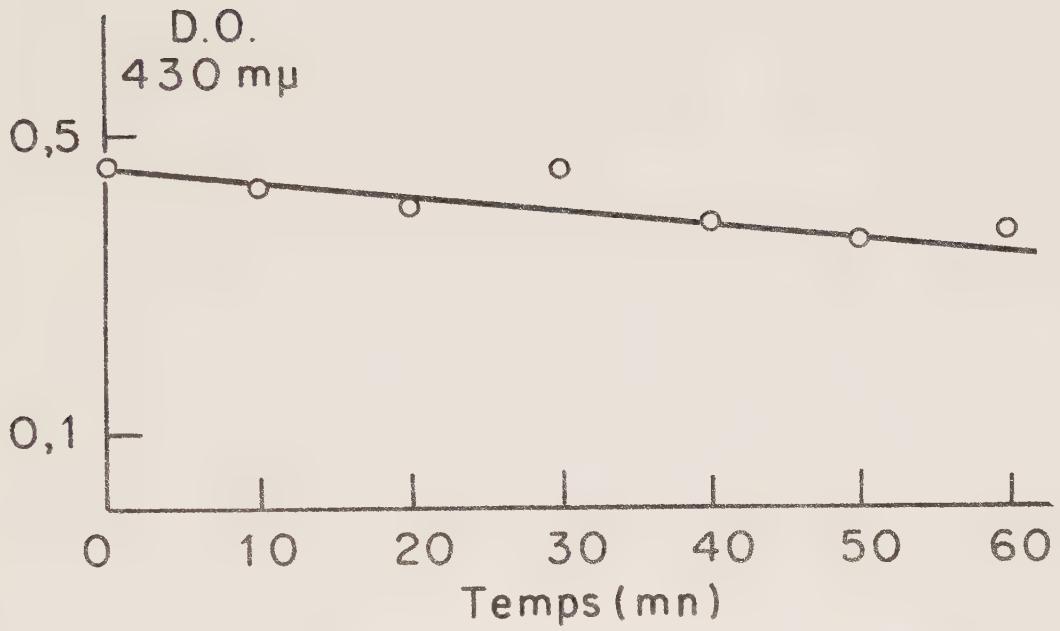


FIG. 22 - Accumulation de PCA chez un mutant proC ρ^- (souche G51). Les valeurs des densités optiques ne sont pas rapportées à 1 mg de protéines. Elles correspondent à une expérience particulière où la densité optique, lue à 600 mμ au spectrophotomètre Zeis, de la suspension bactérienne (incubée en présence de glutamate dans les conditions décrites dans Matériels et Méthodes) était de 21,5.

On pourrait imaginer par exemple une mutation abolissant totalement la perméabilité des bactéries au glutamate. L'accumulation de PCA étant mesurée dans des cellules entières incubées en présence de glutamate, il est clair qu'une telle mutation empêcherait toute évaluation de l'activité PCA synthétase. Mais il faudrait admettre, parmi les mutants proC, l'existence d'une proportion de doubles mutants un peu forte, même compte tenu du fait qu'ils ont été obtenus après mutagenèse à l'éthylméthanesulfonate (sur les quelque 25 mutants que nous avons étudiés, 5 sont du type p^- strict, c'est-à-dire n'accumulant absolument pas le PCA). En outre, et surtout, on peut faire état d'un résultat qui sera exposé en détail plus loin : l'introduction, dans une souche porteuse d'une mutation p^-, d'une deuxième mutation spécifique du métabolisme de la proline, peut restaurer au moins partiellement l'aptitude de cette souche à synthétiser le PCA.

a/ La première question que l'on peut poser est la suivante. Compte tenu de l'incertitude qui subsiste sur les étapes de la biosynthèse de la proline (voir chapitre I), ne peut-on admettre que les mutants p^- sont porteurs d'une mutation affectant la structure d'un enzyme, jusque là non reconnu, nécessaire pour la biosynthèse du PCA ?

A supposer que la PCA réductase ait pour substrat le PCA cyclique, non la forme linéaire du semi-aldéhyde glutamique, on pourrait imaginer que l'équilibre entre les deux formes, cyclique et linéaire, s'effectue lentement et qu'un enzyme est présent pour accélérer la cyclisation. Dans cette hypothèse, les mutants p^- accumuleraient, non le PCA cyclique, mais le semialdéhyde linéaire et il faudrait en outre supposer que le PCA cyclique induit la synthèse de PCA réductase pour expliquer l'absence de cette activité dans les mutants p^-.

Ce dernier point est important car même si l'on envisage de diverses manières ce que pourrait être l'étape enzymatique supplémentaire postulée dans ce type d'hypothèses, on est dans tous les cas obligé de faire appel à l'induction de la synthèse de PCA réductase par le PCA. Or nous avons vu (chapitre IV) que les mutants proA et proB, qui n'accumulent pas le PCA, ont une activité PCA réductase normale et que l'addition, dans le milieu de culture d'un mutant proA, de PCA n'augmente pas cette activité. On doit renoncer à faire du PCA un inducteur de la synthèse de PCA réductase.

Remarquons aussi que dans l'hypothèse que nous venons d'examiner, les mutations proC p^- et proC p^+ sont censées affecter des cistrons différents. Nous verrons que l'étude de la complémentation génétique entre les différents mutants proC ne suggère pas qu'il en soit bien ainsi.

b/ Un deuxième type d'explication du phénotype p^- consiste à supposer que le PCA ne s'accumule pas parce qu'il est dégradé plus vite (ou au même rythme) qu'il n'est synthétisé. Ceci revient à supposer que chez les mutants p^- l'activité de la PCA oxydase est augmentée, soit par suite d'une dérépression de la synthèse de cet enzyme, soit parce que cet enzyme, toujours present en même quantité, serait fonctionnel chez les mutants p^- et verrait son activité masquée chez les mutants p^+.

En soi, cette hypothèse ne rend pas compte du fait que les mutants p^- sont dépourvus de PCA réductase active et, dans ce but, on doit compliquer un peu le tableau. Le plus simple est sans doute d'imaginer que les mutations p^- affectent un gène régulateur dont le produit exerce une action au niveau des gènes de la voie de dégradation et au niveau du gène de structure de la PCA réductase. Quoi qu'il en soit au juste de cette hypothèse supplémentaire, il apparaît que là encore les mutations proC p^- et proC p^+ sont supposées appartenir à deux cistrons différents.

Avant même de rapporter ce que les études de complémentations révèlent à ce sujet, il convient d'indiquer l'existence d'une souche dont les propriétés permettent, semble-t-il, d'écarter l'hypothèse d'une dégradation accélérée du PCA chez les mutants p^-. La souche G 51 a été fabriquée par croisement de l'Hfr C y a 119 (proC) avec G 21 (PCA oxydase) et elle porte la mutation proC du parent Hfr et la mutation PCA oxydase$^-$ du parent F^-. Or cette souche, qui ne peut métaboliser le PCA ni dans un sens ni dans l'autre, est un mutant p^- typique (voir fig. (21)).

c/ Une autre interprétation possible des mutants p^- est qu'ils sont porteurs d'une mutation d'un gène de régulation situé dans la région du cistron proC, mais distinct de celui-ci, mutation qui rend silencieux d'une part, les cistrons proA et/ou proB, d'autre part le cistron proC. Remarquons incidemment que les mutations p^- sont récessives (les mutants proC p^- ont été identifiés comme proC du fait qu'ils étaient complémentables par l'épisome F lac^+ $proC^+$). Formellement, on a donc ici les propriétés d'un système de régulation positive.

Mais de nouveau, cette interprétation fait appel à l'existence, dans la région proC, de deux groupes de complémentation. Voyons ce qu'il en est en réalité.

4 - Complémentation entre les différents mutants proC.

Cette étude a été menée de façon très semblable à ce qui a été relaté pour la complémentation entre les mutants proA et proB. A partir d'un mérodiploïde de structure génétique lac^- proC/F lac^+ $proC^+$, des ségrégants lac^+ pro^- étaient isolés. Pour les trois souches que nous avons utilisées, G22 ($ProCp^+$), G25 ($ProCp^-$) et G 50-68 ($ProCp^+$), complémentées par l'épisome F lac^+ pro C^+ de la souche R VII-3, ces ségrégants étaient assez nombreux (1 à 3 %). Parmi ces ségrégants, on recherchait ceux qui étaient encore capable de retransférer le caractère lac^+ à haute fréquence et parmi ces derniers, ceux qui étaient aptes à fournir des recombinants pro^+ avec plusieurs mutants proC étaient considérés comme porteurs de la région proC, et diploïdes homozygotes pour cette région.

Ainsi ont été isolées trois souches mérodiploïdes homozygotes : G22/F lac^+ proC, G25/F lac^+ proC et G 50-68/F lac^+ proC. Pour déterminer si une mutation proC quelconque était ou non complémentable par l'un de ces trois épisomes on menait l'expérience de la façon suivante :

- La souche F^-, porteuse de la mutation à tester, était croisée en milieu liquide avec la souche F' (à raison de 1 bactérie F^- pour 5 bactéries F', la concentration en bactéries étant environ de 6.10^8 bactéries/ml). 0,1 ml de la suspension diluée 100 fois était étalé sur milieu gélosé sélectif (dépourvu de proline). On faisait un étalement à 0 mn et un autre à 60 mn. Trois types de résultats étaient obtenus :

a/ 0 colonies avec l'étalement effectué à 0 mn,
0 à 50 colonies avec l'étalement effectué à 60 mn.

b/ 10 à 100 colonies à 0 mn
Plus de 1000 colonies à 60 mn, de tailles très inégales.

c/ 10 à 100 colonies à 0 mn,
plus de 1000 colonies à 60 mn, de taille bien homogène.

Dans tous les cas on pouvait vérifier que le transfert de l'épisome avait effectivement eu lieu en effectuant une sélection de recombinants lac^+ sur milieu additionné de proline. La fréquence du transfert était le plus souvent de 5 à 10 %.

Le résultat a/ était interprété comme correspondant à un cas où deux mutations ne se complémentaient pas. Dans le tableau (33), un tel résultat est consigné par le signe - . Le résultat c/, indiqué dans le tableau par le signe +, est considéré comme témoignant d'une complémentation effective. Le résultat b/ est un peu énigmatique. Le grand nombre de colonies obtenu à l'étalement 60 mn est peu compatible avec l'idée qu'il s'agit de recombinants au sens strict, idée suggérée en revanche par l'hétérogénéité de la taille de ces colonies. Ce cas est noté +(?) dans le tableau.

Pour la présentation des résultats, on a groupé les mutants proC testés selon qu'ils étaient p^+ ou p^-. Les quatre premières souches, dans la colonne de gauche (G15, G22, 277, AB 2345) correspondent à quatre mutants p^+ typiques, qui accumulent fortement le PCA. Les quatre dernières souches (G16, G17, G18, G25) sont des mutants proC p^- qui n'accumulent pas du tout. Les souches intermédiaires peuvent être classées comme p^+, bien que leur taux d'accumulation soit inférieur à celui des souches G22 ou X 277. Il est clair que les résultats ne permettent pas de classer l'ensemble des mutants proC en deux groupes comprenant, l'un, les mutants p^-, l'autre les mutants p^+. Et cela, d'ailleurs, que l'on considère les cas notés + (?) comme correspondant ou non à une complémentation effective. Ainsi la mutation G25 (p^-) complémente une mutation p^+ (G15), mais, aussi bien, deux mutations p^- (G16 et G17) (Notons que se trouve éliminée du même coup l'hypothèse selon laquelle les mutations p^- et p^+ appartiendraient à deux cistrons différents et où, en outre, les mutations p^- seraient considérées comme polaires, abolissant l'expression du cistron p^+. Dans ce cas, aucune mutation p^- ne devrait pouvoir complémenter une mutation p^+).

En fait, il paraît plutôt que les quelques cas de complémentation observés relèvent d'un phénomène de complémentation intracistronique. On est ainsi conduit à admettre que les mutations p^+ et p^- appartiennent toutes à un même cistron.

	G 25 (p^-)	G 22 (p^+)	G 50-68 (p^+)
G 15	+	+ (?)	–
G 22	–	–	–
X 277	–	+ (?)	–
AB2345	–	–	–
G 23	–	+ (?)	–
G 24	–	+ (?)	+ (?)
G 26	+ (?)	+ (?)	+ (?)
X 478	–	–	–
G 50 - 68	–	–	–
G 50 - 154	–	–	–
G 50 - 169	–	–	–
G 50 -1710	–	–	–
G 27	+ (?)	+	–
G 16 (p^-)	+	+ (?)	+
G 17 (p^-)	+	+ (?)	+ (?)
G 18 (p^-)	–	–	–
G 25 (p^-)	–	+ (?)	+ (?)

Tableau 33- Complémentation de diverses mutations proC entre elles (cf le texte).

On peut signaler ici une donnée qui tend à confirmer cette manière de voir. Il a été indiqué que, dans un croisement avec l'Hfr OR 21, l'intégration de la région proC, très proche de l'origine du chromosome de l'Hfr, se fait avec une efficacité relativement faible. En fait, pour différents mutants proC, la fréquence des recombinants pro^+ varie dans des proportions considérables, de 1 à 1000 environ. Si l'on admet que dans une série de croisements du type Hfr OR 21 pro^+ x F^- proC où les bactéries Hfr sont en quantité limitante, l'efficacité du transfert de la région proC est en gros toujours la même, alors la fréquence des recombinants pro^+ peut être considérée comme une mesure de la distance de la mutation proC à l'origine de l'Hfr. On a ainsi un moyen d'ordonner les mutations proC, et il apparaît alors que les mutations p^+ et p^- sont disséminées les unes parmi les autres.

Pour que cette façon de procéder soit rigoureuse, il faudrait pouvoir normaliser la fréquence des recombinants pro^+ en la comparant à la fréquence des recombinants pour un marqueur un peu plus éloigné sur le chromosome. C'est ce qui était malheureusement impossible ici où un tel marqueur n'était pas disponible, sauf pour quelques souches, toutes p^+. Il reste qu'il est peu probable que l'énorme variation de fréquence observée soit due simplement aux fluctuations de l'efficacité globale des croisements et, si l'on remarque que des mutants p^- se trouvent aux deux extrémités de cette échelle de variations, on peut considérer ce résultat comme une confirmation qualitative du fait que les mutations p^- et p^+ sont mêlées les unes parmi les autres.

5 - Accumulation de PCA chez les doubles mutants R^- p^-.

Dès lors qu'on admet que toutes les mutations proC, p^- et p^+, sont à l'intérieur d'un même gène, il devient malaisé d'interpréter les mutations p^- comme celles d'un gène de régulation dont le produit aurait pour fonction d'activer l'expression des gènes proA, proB et proC. Il faudrait en effet supposer qu'une même protéine serait dotée de deux fonctions très différentes : d'une part, la fonction activatrice signalée, d'autre part une fonction enzymatique classique, celle de la PCA réductase. Il existe toutefois une autre possibilité, qui est que le produit du gène proC active, non pas les gènes proA et/ou proB, mais leur produit. En d'autres termes, dans cette hypothèse, la PCA synthétase, pour être active, devrait intéragir avec la PCA réductase.

Les mutations p^+ aboliraient l'activité catalytique de la PCA réductase, mais non son aptitude à activer la PCA synthétase, les mutations p^- supprimeraient l'une et l'autre fonction. Les deux types de mutations seraient évidemment récessifs.

Or, la validité de ce modèle peut être mise à l'épreuve. Il laisse prévoir en effet que le phénotype p^- devrait pouvoir, dans certains cas, être transformé en phénotype p^+ grâce à une mutation affectant la structure de la PCA synthétase. De façon plus générale, le phénotype p^- devrait être essentiellement contingent : dans certaines souches une certaine mutation proC donne le phénotype p^-, dans d'autres souches, où la PCA synthétase a une structure un peu différente, le phénotype serait p^+, voire redeviendrait pro^+. Or, il existe des mutations qui affectent la structure de la PCA synthétase sans abolir son activité : ce sont les mutations R^- dont il a été question au chapitre V. Nous avons donc recherché, pour divers couples de mutation (R^-, p^-) ce que devenait l'aptitude à synthétiser le PCA.

La construction des souches porteuses de deux mutations (R^-, proC) a été expliquée au chapitre V et nous n'y reviendrons pas. Considérons alors le tableau (34) où sont indiqués les phénotypes, accumulateur ou non accumulateur, d'un certain nombre de souches de ce genre. On a porté en outre l'activité spécifique de la PCA synthétase de ces différentes souches. Encore une fois, ces valeurs, déduites des pentes d'accumulation ne sont pas à prendre comme des mesures précises de l'activité de la PCA synthétase ; elles permettent toutefois de se faire une idée de la netteté avec laquelle les éventuelles conversions de phénotype se produisent.

Il apparaît en effet que des complémentations entre mutations R^- et p^- ont bien lieu, qui aboutissent à rendre à un mutant p^- l'aptitude à synthétiser du PCA. En outre, cette complémentation est d'amplitude très variable : elle est active pour les couples (G16, G37) et (G25, G37), assez faible pour les couples (G17, G37), à peu près nulle pour le couple (G430, G37). Ce point est important car il permet d'affirmer que le niveau d'activité PCA synthétase observé n'est pas déterminé par la seule structure de la région proA-proB. Si par exemple la mutation R^- de la souche G37 complémentait n'importe quelle mutation p^- à un taux uniforme, ceci reviendrait à dire que l'activité PCA synthétase est totalement indépendante du produit de la région proC. Il serait dans ce cas assez naturel d'interpréter la mutation G37 comme entraînant une synthèse constitutive de PCA synthétase et les diverses mutations p^- comme abolissant l'activité du produit d'un gène régulateur nécessaire

SOUCHE	ORIGINE de la MUTATION pro C	ORIGINE de la MUTATION R^-	ACTIVITE SPECIFIQUE de la PCA-SYNTHETASE
G 430	G 430	–	non décelable
G 431	G 430	G 37	# 4
G 16	G 16	–	non décelable
G 432	G 16	G 37	56
G 17	G 17	–	non décelable
G 32	G 17	G 37	# 4
G 33	G 17	G 36	non décelable
G 25	G 25	–	non décelable
G 433	G 25	G 37	15
G 27	G 27	–	24
G 434	G 27	G 37	70
G 51	Hfr Cya 119	–	non décelable
G 50-Cya 119	Hfr Cya 119	–	87

Tableau 34- Complémentation entre mutations pro C (p^-) et R^-.

pour promouvoir l'expression des gènes proA et/ou proB. Mais il apparaît que pour chaque double mutant l'activité PCA synthétase observée dépend à la fois de la mutation R^- et de la mutation proC. Ceci est ce qu'on attend si l'enzyme PCA synthétase n'est effectivement actif que s'il est combiné avec le produit du gène proC.

Le cas de la souche G51 est inverse. Cette souche est porteuse de la mutation proC de l'Hfr C y a 119. Dans cette dernière souche, la mutation en question a été identifiée comme p^+. Pourtant, la souche G51 a un phénomène p^- typique. Il faut admettre que dans cette souche la région proA-proB diffère un peu de celle de l'Hfr C y a 119 et que les PCA synthétases de ces deux souches sont respectivement non activables et activables par la PCA réductase de l'Hfr C y a 119. On aurait donc ici la conversion d'un phénotype p^+ en p^-.

6 - Mutants réverses pro^+ des mutants pro^c.

Dans ce paragraphe seront présentées quelques observations touchant les mutants réverses pro^+ des mutants proC.

a/ Obtention

Tous les mutants réverses dont il sera question sont des mutants spontanés.

Un ml de milieu complet était ensemencé à partir d'une colonie isolée d'un mutant proC. Après croissance jusqu'à environ 10^9 bactéries/ml, cette culture était centrifugée, le culot bactérien lavé et repris en milieu 63 et étalé sur milieu gélosé dépourvu de proline.

Les fréquences apparentes de réversion observées dans ces conditions étaient échelonnées entre 5.10^{-7} et 5.10^{-9}, selon la mutation proC de départ.

b/ Phénotype des mutants réverses

L'examen des boites de sélection des mutants réverses révélaient presque toujours la présence de colonies excrétrices de proline, repérables grâce à un halo de microcolonies de type parental croissant autour d'elles. Réisolées et retestées dans les conditions ordinaires (voir Matériels et Méthodes) pour l'excrétion de proline, la plupart de ces colonies fournissaient un test positif après

36 h d'incubation, alors que les mutants excréteurs obtenus directement à partir d'une souche prototrophe comme résistants à un analogue de la proline, fournissent généralement un test positif après 12 heures d'incubation. Les mutants excréteurs obtenus comme réverses de mutants proC semblent donc excréter la proline à un taux plus faible que les mutants excréteurs obtenus directement.

Le tableau (35) indique, dans une expérience particulière, la fréquence avec laquelle ces mutants excréteurs s'observent, chez quelques souches, dans la population totale de mutants réverses. Cette fréquence est le plus souvent trop élevée pour qu'on puisse interpréter les mutants réverses excréteurs comme porteurs de deux mutations (outre la mutation proC initiale) : une mutation réverse proprement dite, et une mutation, peut-être localisée dans le cistron proB, entraînant le phénotype excréteur. Cette interprétation est d'autant moins probable que ces mutants réverses sont obtenus comme mutants spontanés.

Un autre fait important révélé par le tableau (35) est que des mutants réverses excréteurs peuvent être obtenus, à partir d'une souche de type p^+ aussi bien que de type p^-. En tout état de cause, ceci montre que, du point de vue de leur mode de réversion, on ne peut établir de différence entre ces deux classes, ce qui cadre bien avec l'hypothèse selon laquelle il s'agit de mutations de phénotypes différents, mais affectant une même unité génétique.

Deux souches toutefois, AB 2345 et χ277 ne donnaient pas, dans l'expérience consignée dans le tableau (35), de mutants réverses excréteurs. L'un et l'autre sont de type p^+. La fréquence apparente de réversion est dans l'un et l'autre cas assez basse et ceci explique vraisemblablement l'absence de mutants réverses excréteurs. Dans le cas de la souche χ 277, nous avons vérifié que de tels mutants réverses peuvent être sélectionnés directement par étalement de la souche sur un milieu dépourvu de proline et additionné de L-thiazolidine-carboxylate à la concentration 6.10^{-3}M.

c/ <u>Localisation</u>

Une étude génétique des mutants réverses excréteurs n'a pas été réalisée. Toutefois, dans un cas particulier, celui de la souche χ 277 r1, (mutant réverse excréteur de χ277), nous avons observé qu'après introduction dans cette souche

SOUCHE	ACTIVITE SPECIFIQUE de la PCA-SYNTHETASE	CLONE 1	CLONE 2	CLONE 3	CLONE 4	CLONE 5	CLONE 6	OBSERVATIONS
X 277	19,1	5	3	6	7	4	–	tous r^+
AB 2345	14,1	3	6	2	9	4	5	tous r^+
G 15	14,5	0	0	7	57 ($1r^-$)	48 ($1r^-$)	–	
G 18	77 1	144	–	–	–	–	–	> 50 % r^-
G 23	6,5	63	91	35	103	108	81	> 50 % r^- partout
G 24	10,8	42	72	–	–	–	–	> 50 % r^-
G 25	1	56	–	–	–	–	–	> 50 % r^-
G 27	24	15 ($3r^-$)	17($13r^-$)	6($4r^-$)	3($3r^-$)	10($3r^-$)	10	

Tableau 35 – Réversion de quelques mutants proC vers le phénotype pro^+. Les nombres sont ceux des colonies réverses trouvées dans un clone étalé dans les conditions décrites dans le texte.

r^- désigne le phénotype excréteur de proline, r^+ le phénotype non excréteur.

d'un épisome $Flac^+$ Pro^+, (provenant de la souche RV 113) on assiste à la ségrégation des caractères "excréteur" et "non excréteur". Ceci indique que l'allèle "non excréteur" est dans ce cas porté par l'épisome. Il ne s'ensuit pas nécessairement que l'allèle "excréteur" soit localisé dans le cistron proC lui-même, mais il est exclu, dans ce cas particulier, qu'il s'agisse d'une mutation dans la région proB. Incidemment, cette observation indique aussi que le caractère excréteur est dominant là encore.

d/Activité spécifique de la PCA réductase chez les mutants réverses excréteurs.

L'excrétion de proline chez certains mutants réverses de mutants proC indique que, d'une manière ou d'une autre, la production de la proline est déréglée chez ces souches. Dans le cas de la souche X 277 rl, on a vu que la mutation responsable de ce dérèglement est située au voisinage de la région proC. Il était alors indiqué de rechercher si l'excrétion n'est pas due à une activité anormalement élevée de la PCA réductase.

Le tableau (36) indique le niveau d'activité de cet enzyme trouvé chez quelques mutants réverses excréteurs. On voit que, bien loin que la PCA réductase ait un surcroit d'activité, dans beaucoup de cas, elle n'est pas détectée. Là où on la décèle, il semble que l'activité soit comparable à celle trouvée chez la souche sauvage.

L'absence d'activité PCA réductase chez certains mutants réverses, excréteurs de proline de surcroît, est à première vue surprenante. Il a été vérifié que dans aucun de ces cas, on n'a affaire à des mutants synthétisant constitutivement la proline-oxydase. Il ne s'agit donc pas d'un phénomène de suppression du type de celui observé pour des mutants proA ou proB et qui permet de sélectionner des mutants constitutifs pour la voie de dégradation (voir chap. IV). Il ne peut pas davantage être question d'une suppression à l'aide d'une mutation affectant la voie de biosynthèse de l'arginine (voir chap. I). D'une part, ces souches n'ont nulle exigence en arginine. D'autre part, la réaction qui est ici en jeu, la transformation du PCA en proline, est strictement spécifique de la biosynthèse de la proline.

SOUCHE	ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA PCA-REDUCTASE
2001 (type sauvage)	3,7
G 16 r1	non décelée
G 16 r3	4,3
G 17 r1	3,9
G 18 r1	non décelée
G 18 r3	non décelée
G 22 r1	non décelée
G 22 r4	3,0
G 23 r1	4,3
G 23 r6	non décelée
G 27 r1	3,2

Tableau 36- Activité spécifique de la PCA-réductase dans l'extrait brut de divers mutants réverses de mutants pro C excréteurs de proline.

e/ Conclusion

Nous proposerons de ces faits l'interprétation suivante :

Pour rendre compte des propriétés des mutants p^-, il a été supposé que la PCA-synthétase n'est active que si elle forme un complexe avec la PCA-réductase. On peut alors faire l'hypothèse supplémentaire que ce complexe est instable *in vitro* et se dissocie facilement dans un extrait brut. Puisque la PCA-réductase est aisément dosable dans un tel extrait, on doit supposer qu'elle ne cesse pas d'être active quand elle est dissociée de la PCA-synthétase. En revanche, certains mutants réverses d'un mutant doté d'une PCA-réductase inactive, pourraient synthétiser un enzyme qui, pour être actif, exigerait d'être associé avec la PCA-synthétase. Dans ce cas, on ne retrouverait pas l'activité PCA-réductase *in vitro*, pas plus que l'activité PCA-synthétase. Par ailleurs, puisque, *in vivo*, les deux enzymes fonctionnent sous forme d'un complexe, on conçoit qu'une modification de structure de la PCA-réductase, telle celle qui peut être réalisée chez un mutant réverse obtenu par une suppression intragénique, puisse modifier l'architecture du complexe PCA-synthétase-PCA-réductase, donc aussi la sensibilité de la PCA-synthétase à la proline. Une désinhibition partielle pourrait s'ensuivre, entraînant elle-même un phénotype excréteur.

Il se pourrait même que la réversion d'un mutant proC s'opère dans certains cas à la faveur d'une mutation affectant la structure de la PCA-synthétase, localisée par conséquent dans les cistrons proA ou proB. De tels mutants réverses auraient nécessairement une PCA-réductase inactive *in vitro*.

C O N C L U S I O N

Nous rassemblons ici les résultats acquis et nous en discuterons les implications éventuelles.

1 - Des mutants affectés dans la voie de dégradation de la proline ont été isolés. Certaines mutations correspondent à la perte de l'activité d'un enzyme, proline-oxydase ou PCA-oxydase, d'autres entraînent une synthèse constitutive de ces enzymes. Les mutations de l'un et l'autre type sont localisées en deux régions différentes du chromosome bactérien.

Les mutations qui entraînent la synthèse constitutive de proline-oxydase ne rendent pas la souche auxotrophe pour la proline, ni ne paraissent retentir sur l'activité spécifique des enzymes de biosynthèse. En fait, rien ne suggère qu'une relation existe entre la régulation de la voie de dégradation et celle de la voie de biosynthèse.

2 - Le nombre des réactions enzymatiques nécessaires pour transformer le glutamate en proline demeure incertain. En revanche, il semble acquis que toutes les mutations qui entraînent l'incapacité à effectuer cette conversion sont localisées, chez Escherichia coli K 12, dans trois cistrons et trois seulement. Le cistron proC est isolé entre les locus lac et pur E. Pour les cistrons proA et proB, situés entre les locus thr-leu et lac, rien ne s'oppose à ce qu'ils soient groupés en une unité fonctionnelle unique.

3 - Rien n'indique que la transcription de ces trois cistrons soit modulée par un système de régulation quelconque. D'une part, la culture en milieu limité en proline n'aboutit pas à augmenter l'activité de la PCA synthétase ou de la PCA réductase. D'autre part, aucun des mutants, que nous avons isolés, chez lesquels la production de proline est déréglée, ne nécessite qu'on fasse appel, pour interpréter ses propriétés, à l'existence d'unités génétiques de régulation, soit du type gène régulateur, soit du type gène opérateur (41).

4 - Si l'activité des gènes gouvernant la biosynthèse parait s'exercer de façon constitutive à un niveau constant, il reste que la production de proline

est réglée de façon stricte, à la faveur d'un mécanisme s'exerçant au niveau de l'activité des enzymes anaboliques. Ce mécanisme comporte deux aspects :

a/ En premier lieu, l'activité de la PCA synthétase est inhibée par la proline. Encore que rien ne soit connu de la PCA synthétase et de sa structure, on peut supposer qu'il s'agit d'un effet de rétro-inhibition s'exerçant au niveau d'un enzyme allostérique.
Les mutations localisées dans la région proB et entraînant le phénotype "excréteur de proline" s'interprètent bien si l'on admet que, chez les mutants correspondants, cette rétroinhibition est abolie, en tout ou partie.

b/ Par ailleurs, il semble que la PCA synthétase n'est active que lorsqu'elle est associée avec la PCA réductase.

Cette conclusion est fondée sur l'existence de mutants pléiotropes négatifs, dont la mutation correspondante est située dans le cistron proC, gène de structure probable de la PCA réductase, et chez lesquels l'activité de la PCA réductase aussi bien que celle de la PCA synthétase est abolie. Nous avons noté p^- ce type de mutation, les mutations p^+ du gène proC abolissant la seule activité de la PCA réductase et respectant celle de la PCA synthétase.

Le fait essentiel est que la mutation p^- peut être convertie en p^+ si l'on introduit dans le cistron proB une mutation R^- (c'est-à-dire, entraînant, dans une souche prototrophe l'excrétion de proline). En outre, une mutation R^- donnée ne complémente pas indifféremment toutes les mutations p^- mais seulement certaines d'entre elles. Ceci exclut qu'on puisse rapporter l'interaction $p^- - R^-$ à un système émetteur-récepteur du type de celui observé dans un opéron soumis à une régulation positive. On considérerait dans ce cas les mutations p^- comme affectant un gène de régulation dont le produit activerait l'expression des cistrons proA et proB. Les mutations R^-, qui permettent de rétablir cette activité en présence d'une mutation p^- seraient à interpréter comme l'équivalent de mutations o^c. Mais dans cette hypothèse, une mutation R^- qui complémente une mutation p^- devrait complémenter n'importe quelle mutation p^-. Or, ce n'est pas ce qu'on observe et l'interprétation la plus probable est qu'on a affaire à une complémentation entre les deux enzymes mutants, PCA synthétase et PCA réductase.

5 - On peut, au sujet de cette activation de la PCA synthétase par la PCA réductase, formuler diverses remarques.

Tout d'abord, il est clair qu'on ne saurait considérer comme prouvée l'existence de l'interaction ici postulée entre deux protéines. La démonstration rigoureuse que les choses se passent bien ainsi nécessiterait qu'on sache déceler l'activité PCA-synthétase in vitro.

Or il est à noter qu'on dispose peut-être d'un moyen nouveau pour partir à la recherche de cette activité. Si nos conclusions sont correctes, il est très vraisemblable que la disparition de l'activité PCA-synthétase dans un extrait brut tient en particulier au fait que l'enzyme se dissocie de la PCA-réductase, nécessaire pour son activation. Apparemment, la PCA-réductase est parfaitement capable de fonctionner à l'état dissocié (puisqu'elle est très active dans un extrait brut) sauf peut être chez des mutants obtenus comme réverses pro^+ de mutants proC, dont on a vu (chapitre VI) que certains sont dépourvus d'activité PCA-réductase. Si l'hypothèse est bonne, selon laquelle cette absence d'activité vient de ce que, chez ces mutants, la PCA-réductase n'est active que sous forme associée, des conditions qui rétabliraient son activité in vitro devraient être aussi des conditions permettant à la PCA synthétase de fonctionner.

On pourrait donc chercher à déceler l'activité de ce dernier enzyme en utilisant en fait le dosage de la PCA-réductase, lequel a l'avantage d'être sensible. Indépendamment d'une démonstration directe, in vitro, du type d'interactions protéiques auquel il est ici fait appel, on prévoit que les mutations réverses de certaines mutations proC pourraient être localisées dans le cistron proB (et vice-versa). De tels types de réversions ont été observés dans d'autres systèmes qui mettent en jeu des associations de chaînes polypeptidiques différentes. Ainsi certaines mutations de la chaîne A de la tryptophane-synthétase, chez E.coli, sont corrigées par des mutations localisées dans le gène de structure de la chaîne B (42). Nous n'avons pas recherché systématiquement de telles mutations réverses. Si elles pouvaient être mises en évidence, leur existence constituerait un fort argument en faveur de l'hypothèse ici proposée.

On trouve dans la littérature des exemples d'interactions entre protéines analogues à celui qui est ici décrit.

Un cas remarquable a été élucidé par Messenguy et Wiame (43) chez la Levure. Ces auteurs ont montré que l'addition d'arginine au milieu de culture induit la synthèse d'une arginase qui, outre sa fonction enzymatique propre, possède la capacité de s'associer avec l'ornithine-transcarbamylase. La formation de ce complexe a pour effet d'inhiber complètement l'activité de cet enzyme de biosynthèse. On voit que ce cas est tout à fait semblable à celui qui nous occupe ici, avec cette différence, évidemment, que dans le système de la proline on aurait affaire à une activation de la PCA-synthétase par la PCA-réductase, au lieu que chez la Levure il s'agit d'une inactivation de l'ornithine-transcarbamylase par l'arginase.

Plus proche peut être de la situation offerte par les enzymes de biosynthèse de la proline serait celle présentée par le complexe de l'anthranilate-synthétase chez E.coli et étudiée par Ito, et Yanofsky (44, 45 et 46). Dans ce cas on a un complexe entre deux chaînes polypeptidiques I et II. L'ensemble du complexe est doté de deux activités enzymatiques : anthranilate-synthétase et phosphoribosyl-anthranilate transférase. A l'état dissocié, la chaîne II conserve cette dernière activité et elle seule, la chaîne I est inactive. Les deux activités du complexe sont inhibées par le tryptophane, mais, à l'état dissocié, l'activité de la chaîne II est insensible à cet agent. On voit que cette description pourrait être reprise point par point et appliquée au cas de la PCA-synthétase. Nous avons montré que la PCA-réductase est insensible in vitro à la proline. On a des raisons de penser qu'in vitro la PCA-réductase est accessible sous forme dissociée. On n'a évidemment aucun moyen de dire si cet enzyme, quand il est associé avec la PCA-synthétase comme on suppose qu'il l'est in vivo est toujours insensible à la proline. Ainsi, une situation du type que nous avons décrit n'est pas exceptionnelle. Il resterait à comprendre pourquoi ce mode d'interaction entre enzymes a été retenu par la sélection naturelle et s'il correspond, dans le cas de la proline, à un mécanisme avantageux, régulateur de la production de proline. En fait ce système parait tirer un caractère rationnel de ce qu'il doit aboutir à rétablir, au niveau du fonctionnement des enzymes PCA-synthétase et PCA-réductase, une coordination qu'on n'a pas lieu de supposer au niveau de la synthèse de ces mêmes enzymes (puisque leurs gènes de structure sont, sur le chromosome, disjoints). En somme la PCA synthétase ne fonctionnerait que dans la mesure où la PCA réductase est présente pour l'activer et métaboliser le PCA au fur et à mesure de sa formation.

Mais ceci n'exclut pas un certain "gaspillage" au niveau de la fabrication des enzymes, laquelle n'apparaît jusqu'à présent susceptible d'aucune régulation. Seule la production de proline paraît ici réglée, sans que celle des enzymes responsables le soit. Peut-être doit on rapprocher ceci d'une observation de Ennis et Gorini (47) qui montraient, chez diverses souches d'E.coli, que la production d'arginine peut rester réglée de façon strictement ajustée aux besoins de la cellule, alors même que la synthèse des enzymes responsables de cette production est tantôt répressible et tantôt inductible par l'arginine. Dans ce cas, c'est la rétroinhibition exercée par l'arginine au niveau du premier enzyme de la chaîne de biosynthèse qui suffit à moduler la production d'arginine de façon satisfaisante. La régulation de l'activité des enzymes, plutôt que celle de leur biosynthèse, semble donc essentielle pour règler la quantité d'acide aminé en fonction des stricts besoins de la cellule.

BIBLIOGRAPHIE

(1) VOGEL, H.J. et S.E. DAVIS, J. Am. Chem. Soc., 74, 109 (1952).

(2) STRECKER, H.J. et P., NELA, B. B. A., 17, 580 (1955).

(3) STRECKER, H.J., J. Biol. Chem. , 225, 825 (1957).

(4) "Studies of biosynthesis in Escherichia coli",Carnegie Institution of Washington Publication, 607 (1955), p.251.

(5) RACKER, E., "Mechanisms in bioenergetics", p. 9 et 46 - Academic Press (1965).

(6) RACKER, E., J. Biol. Chem., 177, 883 (1949).

(7) BURTON, R.M., and E.R., STADTMAN, J. Biol. Chem., 202, 873 (1953).

(8) BLACK, S. and N.C. WRIGHT, J. Biol. Chem., 213, 27, (1955).

(9) HIROTA, Y., M., INUZUKA and M., TOMOEDA, J. Bact., 91, 2392 (1966).

(10) HIROTA, Y., communication personnelle.

(11) PETRAKIS, P.L. et D.M., GREENBERG, B.B.A., 99, 78 (1965).

(12) KUO, Tseng-Tong, et B.A.D. STOCKER, J. Bact., 98, 593 (1969).

(13) ITIKAWA, H., S.BAUMBERG, et H.J. VOGEL, B.B.A., 159, 547 (1968).

(14) REED, D.E. et L.N. LUKENS, J. Biol. Chem., 241, 264 (1966)

(15) HILL, D.L. et P. CHAMBERS, B.B.A., 148, 435 (1967).

(16) MEISTER, A., A.N. RADHAKRISHNAN, et S.D. BUCKLEY, J. Biol. Chem., 229,789 (1957)

(17) SMITH, M.O. et D.M. GREENBERG, J. Biol. Chem., 226, 317 (1957).

(18) FRANK, L. et B. RANHAND, Arch. Biochem. Bioph., 107, 325 (1964).

(19) STRECKER, H.J., J. Biol. Chem., 235, 3218 (1960).

(20) ADELBERG, E.A., M. MANDEL et G. CHEIN CHING CHEN, B.B.R.C., 18 788 (1965).

(21) STRECKER, H.J., J. Biol. Chem. 235, 2045 (1960).

(22) CURTISS, R., III, J.Bact., 89, 28 (1965).

(23) TAYLOR, A.L. et M.S. THOMAN, 50, 659 (1964).

(24) DEMEREC, M., LAHR,MIYAKE,GOLDMAN,BALBINDER,BANIC,HASHIMOTO,GLANVILLE,GROSS, Carnegi Inst. Wash. Year Book, 57, 390 (1958).

(25) SANDWALL, B., Communication personnelle.

(26) JACOB, F. et E.WOLLMAN, in Sexuality and the Genetics of bacteria, Academic Press, New-York (1961).

(27) JACOBY, G.A. et L.GORINI, J.Mol.Biol., 39, 73 (1969)

(28) BAICH, A. et D.J. PIERSON, B.B.A., 104, 397 (1965).

(29) FRANK, L. et P. RYBICKI, Arch. Bioch. Bioph., 95 , 441, (1961).

(30) NOVICK, A. et L. SZILARD, P.N.A.S., 36, 708 (1950).

(31) INGRAHAM, J.L. et A.G. MARR, in"Régulation chez les microorganismes" Editions du C.N.R.S. (1965).

(32) GARTNER, T.K. et M. RILEY, J. Bact., 89, 313 (1965).

(33) COHEN, G. et F.JACOB, C.R. Ac. Sci., 248, 3490 (1959).

(34) UNGER, L. et R.D. de MOSS, J. Bact., 91, 1556 (1966).

(35) UNGER, L. et R.D. de MOSS, J. Bact., 91, 1564 (1966).

(36) FOWDEN L. et M.H. RICHMOND, B.B.A., 71, 459 (1963).

(37) TRISTRAM, H. et S. NEALE, J. Gen. Microbiol., 50, 121 (1968).

(38) TRISTRAM, H. et C.F. THURSTON, Nature, 212, 74 (1966).

(39) CHANGEUX, J.P., Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol.26, P.313 (1961).

(40) KESSEL, D. et M. LUBIN, B.B.A., 57, 32 (1962).

(41) JACOB, F. et J.MONOD, J. Mol. Biol., 3, 318 (1961)

(42) CRAWFORD I., et L.M. JOHNSON, Genetics, 48, 725 (1964).

(43) MESSENGUY, F. et J.M. WIAME, F.E.B.S. Letters, 3, 47 (1969).

(44) ITO, J. et C. YANOFSKY, J.B.C., 241, 4112 (1966).

(45) ITO, J. et C. YANOFSKY, J. Bact. , 97, 725 (1969).

(46) ITO, J. et C. YANOFSKY, J. Bact., 97, 734 (1969).

(47) ENNIS, H.L. et L.GORINI, J. Mol. Biol., 3, 439 (1961).

(48) COLOWICK S.P. et N.O.KAPLAN, Methods in Enzymology, vol.III, p.450, Academic Press, New-York.

(49) TAYLOR A.L. et C.D. TROTTER, Bacteriological Reviews, 31, 332, (1967).

(50) SCHWARTZ N.M. Genetics, 48, 1357 (1963).

R E M E R C I E M E N T S

Je remercie M. François Jacob pour l'intérêt qu'il m'a témoigné tout au long de cette recherche, les discussions multiples, les suggestions, les critiques dont il m'a fait bénéficier.

Je suis extrêmement reconnaissant à Mme M. Gans, à MM. F. Gros et G. Buttin de me faire l'honneur de juger ce travail.

A tous mes camarades des Services de Biochimie Cellulaire et Génétique Cellulaire de l'Institut Pasteur, à supposer que, s'étant hasardés à la lecture de ces pages, ils parviennent à ce terme (hypothèse doublement improbable) je rappelle que, par les aides de toutes sortes qu'ils m'ont apportées, ils sont un peu les auteurs de cet ouvrage. Oserai-je leur demander d'en partager la responsabilité ?